# CHARAKTERISIERUNG DES FERRI-HYDROXAMAT-TRANSPORTSYSTEMS BEI ESCHERICHIA COLI K-12

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF SCHNEIDER
aus Bad Mergentheim

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# CHARAKTERISIERUNG DES FERRI-HYDROXAMAT-TRANSPORTSYSTEMS BEI ESCHERICHIA COLI K-12

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
der Eberhard - Karls - Universität Tübingen

vorgelegt von
RUDOLF SCHNEIDER
aus Bad Mergentheim

1983

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 9. September 1983 |
| Dekan: | Professor Dr. K.-P. Hadeler |
| 1. Berichterstatter: | Professor Dr. V. Braun |
| 2. Berichterstatter: | Priv. Doz. Dr. K. Hantke |

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die ständige Diskussionsbereitschaft und die großzügige Förderung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Braun herzlich bedanken.

Besonders erwähnen möchte ich die fruchtbare Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen mit Sibylle Heidinger, Klaus Günthner und Roy Gross.

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. | Biologische Bedeutung des Eisens | 1 |
| 1.2. | Funktion und Aufbau der Zellwand | 2 |
| 1.3. | Eisentransport bei E.coli | 3 |
| 1.4. | Problemstellung | 6 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | 8 |
| 2.1. | Chemikalien | 8 |
| 2.2. | Nährmedien | 9 |
| 2.3. | Bakterienstämme | 11 |
| 2.4. | Wachstumsbedingungen | 12 |
| 2.5. | Eisenverarmung der Medien | 13 |
| 2.6. | Transportversuche | 13 |
| 2.7. | Ferrichrommodifizierung | 14 |
| 2.8. | Isolierung von Gesamtmembranen | 15 |
| 2.9. | Isolierung von äußerer Membran | 15 |
| 2.10. | Polyacrylamidgelelektrophorese | 16 |
| 2.11. | Pronasebehandlung von Zellen | 17 |
| 2.12. | Proteinbestimmung mit Fluram | 17 |
| 2.13. | Konjugation | 18 |
| 2.14. | λ::Tn10-Phagensuspension | 18 |
| 2.15. | Mutagenese | 19 |
| 2.15.1. | mit MNNG | 19 |
| 2.15.2. | mit Tn10 | 19 |
| 2.15.3. | mit Hydroxylamin | 20 |
| 2.16. | Anreicherung von ferrichrom-sensitiven Mutanten | 20 |
| 2.17. | Biologische Aktivitätstests | 21 |
| 2.17.1. | Wachstumshemmung von Substanzen | 21 |
| 2.17.2. | Wachstumsförderung von Eisenchelatoren | 22 |
| 2.18. | Vorinkubation von Ferrichrom und Ferri-Aerobactin | 22 |
| 2.19. | Colicin V Produktion | 23 |


UNIV. LEIDEN BIBL.

| | | Seite |
|---|---|---|
| 2.20. | Kreuzfütterung zur Überprüfung der Aerobactinsynthese | 23 |
| 2.21. | Darstellung von Aerobactin aus Ferri-Aerobactin | 23 |
| 2.22. | Nachweis der Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin | 24 |
| 2.23. | Darstellung von radioaktiv markiertem Aerobactin | 25 |
| 2.23.1. | $^{14}C$-Markierung | 25 |
| 2.23.2. | $^{3}H$-Markierung | 26 |
| 3. | ERGEBNISSE | 27 |
| 3.1. | Überprüfung der Funktion von fhuA bei der Eisenaufnahme über Aerobactin | 27 |
| 3.1.1. | Eisenaufnahme über Ferrichrom und Ferri-Aerobactin bei BR691, BR692 (fhuA) und BR694 ($clo^R$) | 28 |
| 3.1.2. | Übertragung eines ColV-Plasmids in fhuA Stämme | 32 |
| 3.1.3. | $^{55}Fe$-Aufnahme über Ferrichrom und Ferri-Aerobactin | 32 |
| 3.1.4. | Hemmversuche mit $T_1$, $T_5$, Colicin M und Albomyzin | 37 |
| 3.1.5. | Elektrophoretische Untersuchungen der äußeren Membranen der Stämme SC101, SC104, SC107, SC110 | 38 |
| 3.2. | Ferrichrommodifizierung | 40 |
| 3.2.1. | Einfluß von Acetyl-P | 40 |
| 3.2.2. | Reduktion | 42 |
| 3.2.2.1. | NADH-Dehydrogenase, NADH-Oxidase | 42 |
| 3.2.2.2. | Modifizierung von Desferri-Ferrichrom | 43 |
| 3.2.3. | Ferrichrommodifizierung mit Mutanten in Ferrichrom-Aufnahmefunktionen | 44 |
| 3.2.4. | Isolierung ferrichromsensitiver Mutanten | 45 |
| 3.2.4.1. | Mutagenese mit MNNG | 46 |
| 3.2.4.1.1. | Stabilität der Mutanten | 46 |
| 3.2.4.1.2. | Nährstoffansprüche, aroB | 48 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.2.4.1.3. | Verhalten gegen Hemmstoffe (Colicine, Phagen) | 48 |
| 3.2.4.1.4. | Verwertung von Ferrichrom als einziger Eisenquelle | 50 |
| 3.2.4.1.5. | Eisentransport über Ferrichrom | 52 |
| 3.2.4.1.6. | Ferrichrommodifizierung | 52 |
| 3.2.4.2 | Mutagenese mit Tn10 | 54 |
| 3.3. | Aerobactinmodifizierung | 54 |
| 3.3.1. | Isolierung von Mutanten in der Aerobactinsynthese | 55 |
| 3.3.2. | Transportversuche | 56 |
| 3.3.3. | Wachstumsstimulierung von Ferrichrom und Ferri-Aerobactin nach Vorinkubation | 59 |
| 3.3.4. | Nachweis eines veränderten Aerobactinproduktes in verschiedenen DC-Systemen | 60 |
| 3.4. | Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin mit Membranen | 64 |
| 4. | DISKUSSION | 66 |
| 4.1. | fhuA: Eisentransport mit Ferri-Aerobactin | 66 |
| 4.2. | Ferrichrommodifizierung | 68 |
| 4.3. | Aerobactinmodifizierung | 71 |
| 4.4. | Eisenreduktion | 72 |
| 4.5. | Eisentransport über Hydroxamate | 74 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 75 |
| 6. | LITERATUR | 76 |

Abkürzungen

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| Acetyl-P, AcP | Acetyl-Phosphat |
| bidest. | bidestilliert |
| BPS | Bathophenanthrolindisulfonsäure |
| cpm | counts per minute |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| deion. | deionisiert |
| EAM | Eisenaufnahmemedium |
| E.coli | Escherichia coli |
| EDTA | Äthylendiamintetraacetat, Na-salz |
| Fch | Ferrichrom |
| HEPES | N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-N-2-äthansulfonsäure |
| Min. | Minute |
| MNNG | N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert, Na-salz |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduziert, Na-salz |
| NB | Nutrient Broth |
| NTA | Nitrilotriacetat |
| $OD_x$ | optische Dichte bei x nm |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Std. | Stunde |
| TEAP | Triäthanolaminpuffer |
| TG | Trockengewicht |
| TMED | N,N,N',N'-Tetramethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TY | Trypton-Yeast |

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Biologische Bedeutung des Eisens

An allen vitalen Grundfunktionen lebender Systeme sind gerichtete Elektronenbewegungen beteiligt. Eisen erweist sich dabei aufgrund besonderer chemischer Eigenschaften als höchst variabel einsetzbares Redoxsystem in den beteiligten Redoxreaktionen (85).
Eisen kann in zwei stabilen Valenzen auftreten. Die Ferriform besitzt fünf Elektronen in der d-Schale und ist dreiwertig, die Ferroform dagegen trägt sechs Elektronen in der d-Schale und ist zweiwertig.
Eisen lagert, wie auch andere Übergangselemente, das Sauerstoffmolekül als neutrales symmetrisches Element in komplexer Bindung an. Die komplexbildenden Eigenschaften des Eisens und sein Redoxpotential werden wesentlich beeinflußt durch die chemische Natur und die räumliche Anordnung der Liganden, aber auch durch den hydrophoben Charakter der Umgebung, in die das Eisen eingebettet ist. Dies führt zu der großen Variabilität des Redoxbereichs, in dem Redoxsysteme mit Eisenbeteiligung wirksam werden können. Zwei extreme Beispiele zeigen dies recht deutlich; so besitzen Cytochrome vom a-Typ ein Redoxpotential von +300 mV, während einige Fe-S-Proteine -500 mV aufweisen.
Den günstigen Einsatzmöglichkeiten des Eisens in biologischen Systemen stehen schwerwiegende Nachteile bei der Anreicherung entgegen, die zur Entwicklung besonderer Anreicherungsverfahren geführt haben. Eisen liegt in wässriger Lösung unter oxidierenden Bedingungen in der Fe(III)-Form vor und bildet kolloidale Aquohydroxokomplexe. Das Löslichkeitsprodukt von Eisenhydroxid bei 25° C und einem pH-Wert von 7,0 beträgt $10^{-36}$-$10^{-38}$ (97).
Organische Bestandteile der Biotope (z.B. Phosphate) bilden mit Eisen nichtverwertbare polymere Moleküle. Dazu kommt noch, daß um das jeweils verfügbare Eisen eine große Zahl

von Lebewesen konkurriert.
Untersucht man die Eisenanreicherungsmechanismen lebender Systeme, findet man immer wieder ähnliche Lösungswege. Die Eisen(III)-Ionen der jeweiligen Umgebung werden durch einen Komplexbildner, der ins Medium ausgeschieden werden muß, in eine lösliche Form überführt und in dieser Form in die Zellen transportiert.

## 1.2. Funktion und Aufbau der Zellwand

Die Bakterienzellwand grenzt den Organismus zur Umwelt hin ab und schafft damit die räumlichen Voraussetzungen für das Funktionieren des lebenden Systems. Die Zellwand dient der mechanischen Stabilisierung des Bakteriums, dem Schutz vor destruktiven physikalisch/chemischen Einflüssen und dem gerichteten Stoffaustausch mit der Umgebung.
Die Zellhülle des Bakteriums Escherichia coli ist im Vergleich mit anderen Bakterien recht gut untersucht. Man unterteilt die Zellwand von E.coli grob nach Aufbau, Struktur und Funktion in die innere Cytoplasmamembran und die äußere Membran, zwischen denen sich der periplasmatische Raum mit dem einschichtigen Mureinsacculus erstreckt (11,20). Die Cytoplasmamembran ist aus einer Doppelschicht aus Phospholipiden aufgebaut, in die Proteine mit verschiedenen Funktionen integriert sind. Sie enthält neben den spezifischen Proteinen für aktiven Substrattransport die Enzyme der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Aus dem periplasmatischen Raum können durch osmotischen Schock Bindeproteine von Transportsystemen freigesetzt werden. Daneben wird dem periplasmatischen Raum der Mureinsacculus zugeordnet, der über kovalent gebundenes Lipoprotein mit der äußeren Membran verbunden ist. Lipoprotein kommt in der äußeren Membran auch in einer nichtgebundenen, freien Form vor.
Die äußere Membran tritt über ihr spezifisches Lipopoly-

saccharid in direkten Kontakt mit dem Biotop. Charakteristisch für sie ist im Vergleich mit der Cytoplasmamembran ihr geringer Phospholipidanteil und die geringere Anzahl verschiedener Proteinspecies (33).
Nur hydrophile ungeladene Moleküle bis zu einer Ausschlußgrenze von etwa 600-700 Dalton können die äußere Membran frei passieren. Dies wird ermöglicht durch Proteine, die Poren durch die äußere Membran bilden und deshalb auch Porine genannt werden (5). Diese sogenannten Hauptproteine Ia und Ib tragen zu 60 % zum Gesamtproteingehalt des Membranproteins bei. Die Hauptproteine durchziehen die äußere Membran. Während sie nach innen zu an das Murein binden, ermöglichen sie gleichzeitig bestimmten Phagen, an sie zu binden. Substrate mit Molekulargewichten über der Ausschlußgrenze benötigen spezifische Rezeptorproteine in der äußeren Membran. So dient das lamB-Protein zur Aufnahme von Maltose und höherer Maltodextrine. Dieses Rezeptorprotein benötigt gleichfalls der Phage λ als Anheftungsstelle an die Zelle (23,37,38,39). Vitamin B12 wird nur dann in die Zelle aufgenommen, wenn das Produkt des Gens bfe in der äußeren Membran vorhanden ist, das auch von Phagen BF23 und den E-Colicinen als Rezeptor verwendet wird (21,98,56).
Auf Rezeptorproteine der Eisenchelatoren, die bei E.coli wirksam sind, wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

## 1.3. Eisentransport bei E.coli

Bei E.coli kennt man zur Zeit neben einem unspezifischen Eisenaufnahmemechanismus weitere Wege, auf denen bei Eisenmangelbedingungen Eisen in die Zelle transportiert wird. Diese unterscheiden sich in der chemischen Natur des Komplexbildners und den beteiligten Aufnahmefaktoren, die von den Eisenchelatoren teilweise gemeinsam benützt werden (18,19,62,85,87).
E.coli synthetisiert unter Eisenmangelbedingungen ein Sidero-

phor vom Katecholat Typ, das Enterochelin (26,47,50,59,75,76). Enterochelin ist ein Trimeres aus 2,3-Dihydroxybenzoylserin und wird von der Chorisminsäure ausgehend in mehreren Schritten aufgebaut und in das umgebende Medium ausgeschieden (43,109,118). Nach erfolgreicher Eisenkomplexierung bindet der Eisen-Enterochelinkomplex an das fepA Protein der äußeren Membran (10,65,67). FepA dient gleichzeitig als Rezeptor für Colicin B (53,80,122,49). Die Eisenaufnahme über Enterochelin erfordert außerdem die Genprodukte von tonB und fepB, die in der Cytoplasmamembran vermutet werden (93,95, 111,120). Es gibt Hinweise, daß tonB zur Energieübertragung von der Cytoplasmamembran auf den Rezeptor der äußeren Membran benötigt wird (41,48). FepB transportiert den Eisenenterochelinkomplex durch die Cytoplasmamembran ins Zellinnere. Dort wird zur effizienten Eisenfreisetzung ein weiteres Protein benötigt, das Produkt des Gens fesB. Dieses könnte als Esterase durch Spaltung des Enterochelinmoleküls zur Eisenfreisetzung führen (44,99). Neue Ergebnisse lassen auch die Vermutung zu, daß es sich bei FesB um eine Reduktase handeln könnte (63). Das Enterochelinsystem ist unter den Enterobacteriaceae sehr weit verbreitet. Außer bei E.coli findet man es auch bei Salmonella typhimurium, Enterobacter aerogenes, Shigella sonnei, Klebsiella pneumoniae und Enterobacter cloacae (91).

E.coli kann neben Enterochelin Eisencitrat als Eisenquelle nutzen. Das erforderliche Aufnahmesystem wird durch 1 mM Eisencitrat im Medium induziert. Citrat allein aktiviert das System nicht (40,66,119). In die Zelle transportiert wird nur Eisen nicht aber der Ligand. Der Transport benötigt das FecA Protein als Rezeptor in der äußeren Membran (46,110). Ein FecB Protein in der Cytoplasmamembran vermittelt den Durchtritt des Eisens durch die Cytoplasmamembran. Außer den bisher genannten Eisenkomplexbildnern sind mit Ferrichrom und Ferri-Aerobactin noch zwei weitere Moleküle bekannt, über die sich die Zelle mit Eisen versorgen kann. Die genannten Aufnahmesysteme zeigen untereinander einige Ähnlichkeiten. Einmal gehören beide Liganden zur chemischen Verbindungsklas-

se der Hydroxamate, zum anderen werden mit Ausnahme des jeweiligen Rezeptorproteins in der äußeren Membran weitgehend dieselben Proteinkomponenten der Membran beim Eisentransport verwendet.

Ferrichrom ist ein Eisenkomplexbildner, der zwar von Pilzen (z.B. Ustilago sphaerogena) nicht aber von E.coli synthetisiert wird, den aber E.coli sehr effektiv zum Eisentransport verwendet (54). Ferrichrom ist ein cyclisches Hexapeptid aus alternierenden δ-N-Acetyl-L-δ-Hydroxy-Ornithingruppen und Glycinmolekülen (106).

Der Rezeptor in der äußeren Membran ist das FhuA Protein (94). Diesen Rezeptor benötigen außer Ferrichrom auch die Phagen $T_1$, $T_5$, BF23, das Colicin M und das Antibiotikum Albomycin (24,29,55,78). In pathogenen E.coli Stämmen, die ein ColV-Plasmid enthalten, konnte ein Eisentransportsystem nachgewiesen werden, das Aerobactin als Chelator zur Eisenkomplexierung verwendet (103,115,116,117). Aerobactin besteht aus einem Citrat-Lysin Grundgerüst. Die ε-Amino-gruppen der beiden Lysinreste sind zu Hydroxamatgruppen umgesetzt (42,58). Man konnte zeigen, daß das Eisentransportsystem von einem ColV-Plasmid codiert wird (8,13,14,28,16). Mehrere Gene sind verantwortlich für Enzyme, die die Synthese des Aerobactinmoleküls durchführen (84,89). Einem Gen konnte der Rezeptor für Ferri-Aerobactin in der äußeren Membran zugeordnet werden, der gleichfalls vom Cloacin DF23 als Rezeptor verwendet wird (7,12,45,71,107,108). Das Aerobactinsystem wurde außer bei E.coli bisher bei Aerobacter aerogenes, bei zwei Salmonella-Stämmen, einem Arizona Stamm, in Shigella flexneri und in Enterobacter cloacae gefunden (90,108,112).

In jüngster Zeit entdeckte man, daß auch Coprogen und Rhodotorulasäure von E.coli als Eisenquelle benutzt werden können (57). Den Coprogen-Rezeptor bildet vermutlich ein 76k Protein in der äußeren Membran. Coprogen und Rhodotorulasäure gehören wie Ferrichrom und Ferri-Aerobactin zu den Hydroxamaten (124). Ferrichrom, Ferri-Aerobactin und Coprogen benötigen neben ihrem jeweils spezifischen Rezeptorprotein in der äußeren Membran im weiteren Verlauf einer erfolgreichen Eisenaufnahme

für die Zelle als gemeinsame Faktoren die Produkte der Gene tonB, fhuB, C, D und exbB (56).
Alle Eisenaufnahmesysteme werden unter Eisenmangelbedingungen verstärkt ausgebildet. Sie unterliegen vermutlich einer negativen Kontrolle (51,52,68,69).

## 1.4. Problemstellung

Die vorliegende Arbeit vergleicht einige Abschnitte der Eisenaufnahme über Ferrichrom und Aerobactin bei Escherichia coli. Ein besonderes Schwergewicht bildete dabei die Modifizierungsreaktion, die bei der Eisenaufnahme über Ferrichrom beobachtet wurde (61). Die Modifizierung besteht vermutlich in der Anheftung einer Acetyl-Gruppe an einen Hydroxamatrest des Ferrichroms nach der Eisenfreisetzung. Modifiziertes Ferrichrom konnte im Verlauf der Eisenaufnahme in denselben Mengen im Medium nachgewisen werden wie Eisen in die Zellen transportiert wurde.
Es gelang, die Ferrichrommodifizierung auch in vitro mit Membranen durchzuführen (100). Dazu war die Anwesenheit eines Reduktionsmittels (NADH oder NADPH) notwendig. Durch Zugabe von Acetyl-P konnte das Ausmaß der Reaktion gesteigert werden. Das modifizierte Ferrichrom komplexierte Eisen etwa 100mal schlechter als Desferri-Ferrichrom. Man nimmt an, daß die Ferrichrommodifizierungsreaktion einen wichtigen Schritt bei der Eisenaufnahme über Ferrichrom darstellt.
Die Fragenkomplexe, die der Arbeit die Richtung vorgaben, lassen sich durch folgende Punkte festlegen:

a) Ist die Modifizierung spezifisch für Ferrichrom oder kann sie auch an anderen Hydroxamaten wie dem Aerobactin beobachtet werden?

b) Läßt sich die Modifizierung bisher bekannten Genen beim Eisentransport (tonB, fhuB, C, D)

zuordnen? Gibt es Mutanten, die die Reaktion nicht mehr ausführen? Wie verhalten sich diese?

c) Welche Bedeutung kommt der Ferrichrommodifizierung beim Eisentransport über Ferrichrom zu? Welche Rolle spielt sie für die Zelle?

Ein weiteres Problemfeld im Zusammenhang mit Ferrichrom und Aerobactin entstand, als der Verdacht aufkam, daß FhuA bei der Aufnahme von Aerobactin beteiligt sein könnte. Dieser Frage wurde durch Eisenaufnahmeversuche nachgegangen.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Chemikalien

Alle nicht gesondert benannten Chemikalien sind analysenreine Reagenzien der Firma E. Merck AG, Darmstadt.

| | |
|---|---|
| Acetatkinase | Boehringer GmbH, Mannheim |
| Acetylphosphat | Sigma Chemie GmbH, München |
| Albumin aus Rinderserum | Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg |
| Bacto Agar | Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA |
| Bacto-Tryptone | Difco, s.o. |
| Chelex 100 | Bio-Rad-Laboratories, Richmond Californien, USA |
| Fluram | Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz |
| HEPES | Serva, s.o. |
| MNNG | Serva, s.o. |
| 2-Mercaptoäthanol | Serva, s.o. |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | Serva, s.o. |
| NADH | Boehringer, s.o. |
| NB | Difco, s.o. |
| Pronase P (aus Streptomyces griseus) | Serva, s.o. |
| Quickszint 402 | W. Zinsser KG, Frankfurt |
| Rotiszint 11 | C. Roth, Karlsruhe |
| SDS | Serva, s.o. |
| Servachrom XAD-2 (100-200µ) | Serva, s.o. |
| TMED | Serva, s.o. |
| Tris | Roth, s.o. |
| Yeast Extract | Difco, s.o. |

Die Radiochemikalien stammten von Radiochemical Centre, Amersham, England.
Ferrichrom und Aerobactin waren aus Beständen des Instituts.

## 2.2. Nährmedien

| | | |
|---|---|---|
| TY-Medium: | Bacto Tryptone | 8 g |
| | Yeast Extract | 5 g |
| | NaCl | 5 g |

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| NB-Medium: | Nutrient Broth | 8 g |
| | NaCl | 5 g |

Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| M9-Salze: | $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | 7,5 g |
| | $KH_2PO_4$ | 3,0 g |
| | NaCl | 0,5 g |
| | $NH_4Cl$ | 1,0 g |

Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| M9-Medium: | M9-Salzlösung | 100 ml |
| | Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin (je 1 mg/ml) | 10 ml |
| | p-Aminobenzoesäure, p-Hydroxybenzoesäure (2 mM) | 2 ml |
| | Glucose (40 %, w/w) | 1 ml |
| | Thiamindichlorid (1 mg/ml) | 1 ml |
| | $MgSO_4$-Lösung (1 M) | 0,1 ml |
| | $CaCl_2$-Lösung (0,1 M) | 0,1 ml |
| | $FeCl_3$-Lösung (1 mM gelöst in 0,1 M HCl) | variabel |

Zur Herstellung der jeweiligen Nährplatten wurde 15 g/l Agar zugegeben.

| | | |
|---|---|---|
| Tris-Succinat-Medium: | Tris | 14,5 g |
| | NaCl | 4,7 g |
| | KCl | 1,5 g |
| | $NH_4Cl$ | 2,7 g |
| | $K_2HPO_4$ | 0,36 g |
| | $MgSO_4 \cdot H_2O$ | 0,49 g |
| | $CaCl_2 \cdot H_2O$ | 30 mg |
| | Na-Succinat | 1 g |

Mit HCl auf pH 7,5 einstellen
Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| EAM: | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | 2,07 g |
| | $KH_2PO_4$ | 0,68 g |
| | $(NH_4)_2SO_4$ | 0,66 g |
| | $MgCl_2$ | 0,5 ml 1 M |
| | $CaCl_2$ | 0,2 ml 0,1 M |

Mit einer Mischung aus 5N NaOH und 5N KOH (3:1) auf pH 6,9 einstellen
Mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| lambda_broth: | Trypton | 10 g |
| | NaCl | 2,5 g |

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| lambda_ym: | Trypton | 10 g |
| | NaCl | 2,5 g |
| | Bacto Agar | 6,5 g |

Mit deion. Wasser auf 1 l auffüllen

| | | |
|---|---|---|
| SM: | Tris | 0,02 M |
| | NaCl | 0,1 M |
| | $MgSO_4$ | 0,01 M |

pH mit HCl auf 7,5 einstellen

## 2.3. Bakterienstämme

| | | |
|---|---|---|
| AB2847 | E.coli K-12 aroB thi tsx malT | (92) |
| 1422 | AB2847 rpsL cir | dieses Institut |
| P8 | AB2847 fhuA | dieses Institut |
| BR158 | AB2847 tonB | dieses Institut |
| RK3931 | AB2847 fhuB | dieses Institut |
| RK3944 | AB2847 fhuA | dieses Institut |
| KL79 | AB2847 fhuB | dieses Institut |
| FS44, FS12, FS40, FS25, Fs19, FS33, Fs41, FS39, Fs22, FS27, Fs37, FS35 | abgeleitet von AB2847, ferrichromsensitiv | diese Arbeit |
| K311 | Wildtyp, pColV-K311 | P. Frédericq |
| K311/1130 | K311 aroB | dieses Institut |
| KH576 | C.coli K-12 W3110 pColV-K30 | K. Hardy |
| BR691 | 1422 pColV-K30 | V. Braun |
| BR692 | BR691 fhuA | V. Braun |
| BR694 | BR691 Cloacin-resistent | V. Braun |
| EN777 | W3110 pColV-K311::Tn10 | F. Engelbrecht |
| EN775 | E.Coli K-12 araD Δ lac aroB rpsL thi pColV-EN777 | F. Engelbrecht |
| a19 | aus EN777 Aerobactin-synthese-negativ | dieses Institut |
| AS112, AS505 AS521, AS445 | EN775 Aerobactin-synthese-negativ | diese Arbeit |
| AN193 | E.coli K-12 ara entA lac leu mtl proC rpsL supE thi fhuA trpE xyl | (116,117) |
| SC101 | Kreuzung 311xP8 | diese Arbeit |
| SC104 | Kreuzung 311/1130xP8 | diese Arbeit |
| SC107 | Kreuzung 311xAN193 | diese Arbeit |
| SC110 | Kreuzung 1130xAN193 | diese Arbeit |
| H101 | recA $r^-$ $m^-$ supE lacY leu thi pro | J. Collins |
| H416 | H101 aro | dieses Institut |

| | | |
|---|---|---|
| H506 | recA minA minB lacY xyl thi mtl | dieses Institut |
| N12 | H506 $r^-$ $m^-$ fhuC | L. Fecker |
| TeTu93 | H416 fhuB fhuD | L. Fecker |
| ymel | E.coli K-12 lacI metE ilv thi | dieses Institut |
| 487 | E.coli K-12 ymel lacI metE ilv thi (NADH-Oxidase-negativ) | dieses Institut |
| Iyl3 | E.coli K-12 try his rpsL thi ilv | dieses Institut |
| Iyl2 | E.coli K-12 Iyl3 try his rpsL thi ilv ndh (NADH-Dehydrogenase-negativ) | dieses Institut |
| H1367 | E.coli K-12 pro lac aroB $mal^+$ | K. Hantke |
| H1388 | E.coli K-12 455 aroB lac pro malT exbB | K. Hantke |
| NK5336 | E.coli K-12 $su^+$/nga | dieses Institut |

## 2.4. Wachstumsbedingungen

Ausgehend von Einzelkolonien auf TY-Platten wurden die Zellen über Nacht bei 37° C vorgezüchtet. Mit dieser Stationärkultur wurde entsprechendes Medium auf eine $OD_{578}$ von 0,05 angeimpft. Abhängig von den Versuchsanforderungen wurden die Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen geerntet. Zur Gewinnung von Gesamtmembranen wurden stationäre Kulturen verwendet ($OD_{578}$=2,0).
Für Transportmessungen dagegen mußten die Bakterien in der log-Phase sein ($OD_{578}$=0,5).
Eine $OD_{578}$ von 1,0 entspricht einer Zelldichte von $10^9$/ml oder einer Bakterienmasse von 0,38 mg/ml.

## 2.5. Eisenverarmung der Medien

M9-Salze wurden zehnfach konzentriert über eine Chelex 100-Säule gegeben, mit dem doppelten Volumen bidest. Wasser eluiert und fünffach konzentriert autoklaviert. Sie wurden mit bidest. Wasser verdünnt.
Glucose wurde ebenfalls mit Chelex 100 eisenverarmt. Um Eisenmangelbedingungen auf Platten herzustellen, wurden 100 µM NTA und 200 µM Bipyridin in NB-Agar gegeben.

## 2.6. Transportversuche

Die Zellen wurden in NB-Medium bis zu einer $OD_{578}$ von 0,5 angezüchtet. Man zentrifugierte mit 5000 x g in 10 Min. bei $4^{\circ}$ C ab und wusch zweimal mit EAM. Die Bakterien wurden anschließend in EAM zu einer $OD_{578}$ von 0,5 resuspendiert. Um das niedrigaffine Eisenaufnahmesystem zu unterdrücken, gab man 100 µM NTA zu. Bis zum eigentlichen Transportversuch stellte man die Zellen auf Eis. Fünf Minuten vor Beginn des Experiments gab man 0,4 % Glucose in die Transportansätze und inkubierte bei $37^{\circ}$ C.
Der Transport wurde gestartet durch Zugabe der radioaktiv markierten Substrate. Zu bestimmten Zeiten wurden jeweils 0,5 ml Probe entnommen und auf Membranfilter gegeben. Diese wurden zweimal mit 5 ml 0,5 M LiCl gewaschen und zwei Std. bei $60^{\circ}$ C getrocknet. Nach Zugabe des Szintillators konnte die Substrataufnahme durch Radioaktivitätsmessung am Szintillationszähler bestimmt werden.
Die Transportrate wird im allgemeinen im Ergebnisteil aufgetragen als cpm in Abhängigkeit von der Zeit. Dabei entsprechen 1000 cpm 30 pmol/mg TG.

## 2.7. Ferrichrommodifizierung

Die Ferrichrommodifizierung konnte mit ganzen Zellen und Zellmembranen nachgewiesen werden. Im allgemeinen führte man die Reaktion mit Membranen durch.
Ein Gesamtansatz mit Membranen bestand aus 250 µl.
Als Cosubstrate wurden 10 mM NADH und 20 mM AcP zugegeben. Die Proteinkonzentration der Membranen pro Ansatz betrug 1-2 mg. $^{3}$H-Ferrichrom war mit einer Konzentration von 10 µM vorhanden. Die Reaktion wurde in 100 mM TEAP (pH 7,0) bei 37° C und 3-5 Std. dauernder Inkubation durchgeführt. Ferrichrommodifizierung mit ganzen Zellen erfolgte gewöhnlich in NB-Medium ohne Zusatz von Cosubstraten unter gleichen Inkubationsbedingungen wie die Reaktion mit Membranen. Ein Gesamtansatz betrug 500 µl. Die Zelldichte wurde auf eine $OD_{578}$ von 0,5 oder 1,0 eingestellt. Nach der Inkubation wurden die ungelösten Membranbestandteile bzw. ganze Zellen abzentrifugiert. Zu den Überständen gab man jeweils 100 µl XAD-2-Suspension (entsprach 15 mg XAD Trockensubstanz) und 1 ml bidest. Wasser. Anschließend wurde viermal mit 1 ml bidest. Wasser gewaschen. Die adsorbierten Ferrichromprodukte wurden mit jeweils 500 µl $H_2O$/Methanol/1:1 vom Harz desorbiert. Nach Einengen des $H_2O$/Methanol-Gemisches am Wasserstrahlvakuum gab man 500 µl 100 mM HEPES-Puffer (pH 6,0) und den zehnfachen Überschuß an Eisen in den Ansatz, um eventuell entstandenes Desferri-Ferrichrom in Ferrichrom überzuführen. Nach drei Std. Inkubation bei 37° C wurden die Ferrichromprodukte mit 100 µl XAD-2-Suspension vom Puffer und dem überschüssigen Eisen getrennt. Nach dreimaligem Waschen mit bidest. Wasser wurden Ferrichrom und das modifizierte Produkt wieder mit 500 µl $H_2O$/Methanol/1:1 vom Harz desorbiert. Nach Einengen von $H_2O$/Methanol zur Trockene wurde das Material in 20 µl Methanol aufgenommen und auf DC-Kieselgelplatten aufgetragen. Die Auftrennung des modifizierten Ferrichroms vom Ferrichrom erfolgte in Chloroform-Methanol-$H_2O$/65:65:4. Der Nachweis der Substanzen wurde an einem Scanner mit Integrationsvorrichtung durchgeführt.

Die wichtigsten Einstellungen am Scanner:
Vorschubgeschwindigkeit: 300, 1200 mm/Std.
Meßbereich (MR): 10, 30, 100 oder Integration
Zeitkonstante (TC): 1, 3

## 2.8. Isolierung von Gesamtmembranen

Die Zellen wurden in 1 l TY-Medium bis zu einer $OD_{578}$ von 2,0 gezüchtet. Danach zentrifugierte man sie 15 Min. mit 8000 x g bei 4° C ab und wusch sie einmal mit 300 ml 100 mM TEAP (pH 7,0). Die gewaschenen Bakterien wurden in 15 ml TEAP aufgenommen und in einer French press cell zweimal mit 20 000 psi aufgeschlossen. Um übriggebliebene ganze Zellen oder größere Zelltrümmer zu entfernen, wurde 15 Min. bei 5000 x g in 4° C zentrifugiert. Die Zellmembranen erhielt man durch Ultrazentrifugation des Zellausschlusses bei 4° C mit 180 000 x g in 90 Min. Die Membranen wurden einmal gewaschen und in 1 ml TEAP aufgenommen.

## 2.9. Isolierung von äußerer Membran

Die Zellen wurden in 100 ml TY-Medium bis zu einer $OD_{578}$ von 0,5 angezüchtet. Danach zentrifugierte man 15 Min. mit 8000 x g bei 4° C ab.
Das Zellsediment wurde auf Eis gestellt und in 0,5 ml 0,2 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen.
Nun wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben, wobei jedesmal gemischt wurde:
1 ml 0,2 M Tris-HCl, 1 M Sucrose (pH 8,0),
0,1 ml 10 mM EDTA (pH 8,0),
0,1 ml Lysozym (Stammlösung 2 mg/ml),
3,2 ml $H_2O$ bidest.

Die Zellen blieben 10 Min. bei Raumtemperatur stehen. Die Sphäroplastenbildung konnte dabei unter dem Mikroskop verfolgt werden. Nach 10 Min. pipettierte man 10 ml Extraktionspuffer und 0,1 ml DNase (Stammlösung 1 mg/ml) in die Zellsuspension. Der Extraktionspuffer war eine Mischung aus 2 % Trition-X-100, 50 mM Tris-HCl und 10 mM $MgCl_2$ mit einem pH-Wert von 8,0.
Nach Zugabe der DNase sollte die Lösung nicht mehr viskos sein.
Die Membranen wurden nach Zugabe des Extraktionspuffers in 60 Min. mit 20 000 x g abzentrifugiert. Man wusch sie noch dreimal mit $H_2O$ bidest. in Eppendorfgefäßen. Die gewaschenen Membranen wurden in 300 µl $H_2O$ bidest. aufgenommen.

## 2.10. Polyacrylamidgelelektrophorese (71,79)

Die Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung der Proteine der äußeren Membran verwendet. Die Proteinproben (1-5 mg/ml) wurden in einem Auftragspuffer bestehend aus 2 % SDS, 10 % Glycerol, 5 % 2-Mercaptoäthanol und 0,001 % Bromphenolblau in 0,0625 M Tris 5 Min. lang gekocht. Nach dem Abkühlen wurden bis zu 20 µl in die Taschen des Konzentrierungsgels aufgetragen. Dieses bestand aus 3 % Acrylamid, 0,08 % Methylenbisacrylamid und 0,1 % SDS in 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8). Die Polymerisation wurde eingeleitet durch Zugabe von 0,2 % Ammoniumpersulfat und 0,02 % TMED.
Die Auftrennung der Proteine erfolgte im anschließenden Trennungsgel. Dieses enthielt 11 % Acrylamid, 0,2 % Methylenbisacrylamid und 0,2 % SDS in 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8).
Die Polymerisation erfolgte wie beim Konzentrierungsgel nach Zugabe von 0,02 % Ammoniumpersulfat und 0,02 % TMED. Der Elektrophoreselauf wurde bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke (15 mA) durchgeführt, wobei ein Laufpuffer aus 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS in 0,025 M Tris-HCl (pH 8,0)

verwendet wurde.
Die Färbung der Proteine erfolgte mit Coomasie Blue gelöst in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure. Die Gele wurden mit einer wässrigen 7,5 % Essigsäure-/5 % Methanollösung entfärbt.

## 2.11. Pronasebehandlung von Zellen (121)

Exponentiell wachsende Zellen ($OD_{578}$=0,5) wurden abzentrifugiert (10 Min; 5000 x g; 4° C) und zweimal mit EAM gewaschen. Das Sediment wurde in einem 1/20 Volumen EAM mit 5 mg/ml Pronase aufgenommen. Man inkubierte 30 Min. bei 37° C im Schüttelbad und verdünnte anschließend mit EAM 1:20. Diese Zellsuspension wurde direkt in Eisenaufnahmeexperimente eingesetzt.

## 2.12. Proteinbestimmung mit Fluram (105)

Eine Proteinlösung mit 1-100 µg Protein wurde mit 0,2 M Na-Boratpuffer (pH 9,0; mit NAOH eingestellt) auf 1,5 ml aufgefüllt und mit 0,5 ml einer frisch angesetzten Fluramlösung (3 mg in 10 ml wasserfreiem Dioxan) schnell gemischt. Die Proteinmenge konnte durch Fluoreszenzmessung am Photometer mit Fluoreszenzaufsatz bestimmt werden. Bei jeder Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin mitgemessen.

## 2.13. Konjugation

Donor und Rezipient wurden in TY-Medium über Nacht angezüchtet. Jeweils 0,5 ml Donor und Rezipient wurden abzentrifugiert. Der Donor wurde in 0,5 ml, der Rezipient in 0,1 ml TY-Medium aufgenommen.
Anschließend gab man 0,1 ml der Donor-, und 0,1 ml der Rezipientensuspension auf ein steriles Filter und inkubierte dieses auf einer TY-Platte 6-15 Std. bei 37° C. Danach wurde der Filter mit 3-5 ml M9-Salzlösung gewaschen. 0,1 ml davon verteilte man auf Selektionsplatten, die das Wachstum von Donor und Rezipient unterdrückten.

## 2.14. λ::Tn10 Phagensuspension

Zur Phagenvermehrung wurde der Stamm NK5336 verwendet, da sich der λ::Tn10 Phage nur in $Su^+$-Stämmen vermehrt.
Zuerst mußten frische Plaques des λ-Phagen hergestellt werden. Dazu züchtete man Zellen des Stammes NK5336 in lambda ym auf eine $OD_{578}$ von 0,05 vor. Man vermischte 0,1-0,15 ml Zellen und eine ältere Phagensuspension in weniger als 0,2 ml Gesamtvolumen. Nach 20 Min. Adsorption wurde die Suspension zusammen mit 2,5 ml lambda Weichagar auf frische lambda ym Platten gegeben und bei 37° C inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden 1-5 frische λ-Plaques (höchstens 12 Std. alt) zusammen mit 0,15 ml Übernachtkultur des Stammes NK5336 in lambda broth und 0,5 ml lambda broth gut gemischt. Die Phagen konnten 20 Min. bei Raumtemperatur adsorbieren, bevor 7,5 ml lambda Weichagar zugegeben wurde. Diese 7,5 ml Weichagar wurden auf 3 frische lambda Agar Platten (höchstens 24 Std. alt) verteilt. Man inkubierte bei 37° C, bis die Platten klar waren. Anschließend wurde der Weichagar abgekratzt und in Zentrifugengläser zusammen mit 2 ml SM und 0,2 ml $CHCl_3$ gegeben. Dort wurde die Suspension mit einem Vortex 10 Min. auf höch-

ster Stufe gemischt. Man zentrifugierte vom Unlöslichen ab (10 Min. 5000 x g) und titrierte den Überstand. Der Phagentiter sollte $1\text{-}3 \times 10^{10}$/ml betragen.

## 2.15. Mutagenese

### 2.15.1. mit MNNG (81)

Zellen wurden in TY-Medium bis zu einer $OD_{578}$ von 0,4 gezüchtet. 5 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (10 Min./5000 x g/4° C) und zweimal mit 5 ml Citratpuffer gewaschen. Das Sediment wurde in 4 ml Citratpuffer aufgenommen. Zu den resuspendierten Zellen gab man 0,2 ml einer MNNG-Stammlösung und inkubierte 30 Min. bei 37° C. Die MNNG-Stammlösung wurde unmittelbar vor Gebrauch angesetzt, indem man 1 mg MNNG in ein steriles Reagenzglas einwog, in einem Tropfen Dimethylsulfoxid löste und 0,9 ml Citratpuffer zugab. Nach der MNNG-Mutagenese wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,0) gewaschen und in 10 ml NB-Medium aufgenommen. Im NB-Medium wurden sie über Nacht bei 37° C inkubiert.
Die Überlebensrate der Zellen nach der MNNG-Mutagenese betrug 10 %.

### 2.15.2. mit Tn10 (70)

Mit einer Übernachtkultur der Zellen in lambda ym-Medium wurden 10 ml dieses Mediums auf eine $OD_{578}$ von 0,05 angeimpft. Das Wachstum erfolgte bis zu einer $OD_{578}$ von 0,5-1,0. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 Min.; 5000 x g) und in

1/20 Volumen (= 0,5 ml) lambda ym aufgenommen. Dazu gab man einen λ::Tn10-Phagen. (Die Herstellung der Phagensuspension ist beschrieben in 2.14.) Die MOI sollte 0,2 betragen. Man inkubierte anschließend 45 Min. bei 37° C. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit lambda ym-Medium, das zusätzlich 2,5 mM Na-Pyrophosphat enthielt, zweimal gewaschen, um eine weitere Phagenadsorption zu verhindern. Danach züchtete man die Zellen über Nacht bei 37° C in lambda ym-Medium, das als Zusätze 2,5 mM Na-Pyrophosphat und 20 mg/ml Tetrazyklin enthielt. Auf diese Weise wurde selektiert auf diejenigen Zellen, die das Tn10 in das Chromosom integriert hatten.

### 2.15.3. mit Hydroxylamin (81)

Man züchtete den betreffenden Stamm in 5 ml M9-Minimalmedium über Nacht bei 37° C an. Die Übernachtkultur wurde abzentrifugiert (10 Min., 5000 x g, 4° C), einmal in M9-Salzen gewaschen und in 4 ml 1 M $NH_2OH \cdot HCl$ (pH 6,0) resuspendiert. Man inkubierte 20 Min. bei 37° C, zentrifugierte ab, wusch zweimal mit kaltem NB-Medium und ließ die Zellen über Nacht in NB-Medium bei 37° C wachsen.

### 2.16. Anreicherung von ferrichromsensitiven Mutanten

Zellen wurden wie in 2.15.1. beschrieben mit MNNG mutagenisiert. Mit der Übernachtkultur der mutagenisierten Zellen wurden 10 ml NB-Medium, das noch zusätzlich 100 µM Ferrichrom und 1 mM Citrat enthielt, auf eine $OD_{578}$ von 0,05 angeimpft und bei 37° C inkubiert. Bei einer $OD_{578}$ von 0,4 gab man Streptocotocin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml zu. Nach 1 Std. wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Min.;

5000 x g; 4° C), zweimal mit sterilem NB-Medium gewaschen und über Nacht in NB-Medium bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein erneuter Anreicherungsschritt unter denselben Versuchs- und Wachstumsbedingungen, aber diesmal mit Ampicillin durchgeführt, wobei die Ampicillinendkonzentration 20 µg/ml betrug. Nach der Ampicillin-Anreicherung der Mutanten wurden die Zellen in NB-Medium über Nacht bei 37° C inkubiert. Diese Übernachtkultur gab man in entsprechenden Verdünnungsstufen so auf TY-Platten, daß etwa 100 Kolonien pro Platten wuchsen. Die Kolonien wurden auf NB-Platten mit 50 µM Ferrichrom und auf NB-Platten ohne Ferrichrom gestempelt. Kolonien, die auf NB-Platten mit Ferrichrom nicht wachsen konnten, dagegen gutes Wachstum auf Platten ohne Ferrichrom zeigten, wurden als ferrichromsensitive Zellen angesehen.
Die Isolierung ferrichromsensitiver Mutanten nach Tn10 Mutagenese, beschrieben in 2.15.2., erfolgte nach demselben Schema. Die Anreicherung mit Streptocotocin und Penicillin wurde hier in lambda ym-Medium mit zusätzlich 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 20 µg/ml Tetrazyklin und 1 mM Citrat durchgeführt. Die Ferrichromkonzentration betrug 100 µM.
Die Selektion der Mutanten erfolgte auf TY-Platten mit denselben Zusätzen, wobei die eigentlichen Selektionsplatten 50 µM Ferrichrom enthielten.

## 2.17. Biologische Aktivitätstests

### 2.17.1. Wachstumshemmung von Substanzen

Man gab 2,5 ml Weichagar mit 0,1 ml einer Stationärkultur auf eine Agarplatte (NB- oder TY-Platten). Nach Erkalten des Weichagars pipettierte man direkt einen Tropfen der Hemmsubstanzen (z.B. Phagen $T_1$, $T_5$, Colicine) auf die Agaroberfläche oder brachte die Hemmsubstanz in Filterrondellen auf

die Platte.

### 2.17.2. Wachstumsförderung von Eisenchelatoren

Man brachte 2,5 ml Weichagar mit 0,1 ml stationärer Zellen auf NB-Platten mit 100 µM NTA und 200 µM Dipyridyl.
Auf den erkalteten Weichagar legte man Filterrondellen, die mit 15 µl einer 1 mM Stammlösung der Eisenverbindungen (meist Ferrichrom oder Aerobactin) getränkt waren.

### 2.18. Inkubation von Zellen mit Ferrichrom und Ferri-Aerobactin

Zellen wurden in NB-Medium vorgezüchtet bis zu einer $OD_{578}$ von 0,4 und anschließend 1 Std. mit 200 µM Bipyridin bei 37° C inkubiert. Danach wurden sie abzentrifugiert (5000 x g; 10 Min.), zweimal mit kaltem NB-Medium gewaschen und in NB zu einer $OD_{578}$ von 0,5 aufgenommen. Man gab Ferrichrom und Aerobactin in definierter Konzentration zu. Anschließend wurden die Ansätze im Schüttelbad bei 37° C inkubiert.
Zu bestimmten Zeiten nahm man 30 µl Probe, zentrifugierte die Zellen ab und pipettierte 15 µl des Überstandes auf Filterrondellen. Diese Filterrondellen legte man auf Eisenmangelplatten, die in Weichagar einen Indikatorstamm trugen, der mit den Hydroxamaten wachsen, aber selbst keine Chelatoren synthetisieren konnte. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37° C wurden die Wachstumshofdurchmesser ausgemessen. Die Wachstumshofdurchmesser wurden mit Hilfe einer Eichkurve in Konzentrationswerte umgerechnet.

## 2.19. Colicin V Produktion

Zellen des Stammes, der getestet werden sollte, wurden punktförmig auf TY-Platten geimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert, um eine Kolonie auszubilden. Die Zellen der Kolonie wurden mit $CHCl_3$ abgetötet. Dazu legte man die Platten über Filterpapierstreifen, die mit $CHCl_3$ getränkt waren. Nach 1 Std. belüftete man die Platten eine weitere Stunde, um $CHCl_3$ vollständig zu entfernen. Auf die abgetötete Zellkolonie schichtete man 0,1 ml eines sensitiven Stammes in 2,5 ml TY-Weichagar. Als sensitiven Stamm verwendete man meist AB2847.
Nach Inkubation über Nacht bei 37° C bildeten Colicin V Produzenten einen Hemmhof um die Kolonie im Wachstumsrasen des Teststammes.

## 2.20. Kreuzfütterung zur Überprüfung der Aerobactinsynthese

Man brachte 0,1 ml einer Stationärkultur von vermuteten Aerobactin-Synthesemutanten in 2,5 ml Weichagar auf Eisenmangelplatten. Auf diese Platten legte man sterile Filterrondellen, auf die 10 µl einer 1:10 verdünnten Übernachtkultur eines Synthese-positiven Stamms pipettiert wurden.
Aerobactinproduzenten bildeten um die Filterrondellen einen Wachstumshof.
Mutanten im Aerobactinsynthesesystem konnten sich wechselseitig nicht kreuzfüttern.

## 2.21. Darstellung von Aerobactin aus Ferri-Aerobactin

50 mg Ferri-Aerobactin wurden in 12 ml $H_2O$ bidest. (200fache

Menge) gelöst und mit der 1,5fachen Menge 8-Hydroxychinolin (also 75 mg) gelöst in 2 ml Methanol versetzt. Diese Suspension wurde nach sorgfältigem Abdecken 24 Std. gerührt. Den entstehenden schwarzen Niederschlag zentrifugierte man ab. Der gelbe Überstand wurde über ein Filter vollständig von der Fällung getrennt. Den Niederschlag wusch man noch zweimal mit insgesamt 4 ml bidest. Wasser.
Die zusammengeleerten gelblichen Überstände extrahierte man dreimal mit je 5 ml Chloroform, um gelöstes 8-Hydroxychinolin aus der wässrigen Phase zu entfernen. Die fast farblose, wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer bei 30-35° C eingeengt, bis alle organischen Bestandteile verflüchtigt waren. Anschließend wurde sie tiefgefroren und lyophilisiert. Die Ausbeute an Aerobactin betrug zwischen 75 und 80 %. Desferri-Ferrichrom wurde nach derselben Methode aus Ferrichrom hergestellt.

## 2.22. Nachweis der Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin

Das Reagens Bathophenanthrolindisulfonsäure (BPS) komplexiert spezifisch $Fe^{2+}$-Ionen.
In einem Reaktionsansatz wurden 20 µM $^{55}Fe^{3+}$ zusammen mit 100 µM Aerobactin bzw. 100 µM Desferri-Ferrichrom und 100 µM BPS in 100 mM TEAP pH 7,0 bei 37° C unterschiedliche Zeiten inkubiert. Zusätzlich gab man NADH in verschiedenen Konzentrationen und 750 µg Gesamtmembranen bestimmter Stämme in den Testansatz. Reduziertes Eisen wurde von BPS komplexiert. Nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile trug man den gesamten Überstand auf eine Kieselgel-DC-Platte und trennte mit Methanol/$H_2O$ 1:1 $^{55}Fe^{2+}$-BPS von Ferrichrom bzw. Ferri-Aerobactin. Die Rf-Werte betrugen jeweils:
Ferrichrom 0,51, Aerobactin 0,68, $Fe^{2+}$-BPS 0,92.
Der Nachweis der Radioaktivität an den betreffenden Positio-

nen erfolgte mit einem DC-Scanner. Dessen Integrationsvorrichtung erlaubte eine quantitative Auswertung.

## 2.23. Darstellung von radioaktiv markiertem Aerobactin

### 2.23.1. $^{14}$C-Markierung

Die Zellen eines Aerobactin produzierenden Stammes (EN775) wurden in 10 ml Tris-Succinat Medium mit zusätzlich 0,8 % NB bis zu einer $OD_{578}$ von 0,3 gezüchtet. Anschließend zentrifugierte man ab (5000 x g, 10 Min.), wusch einmal in 100 mM HEPES-Puffer pH 6,0 und nahm die Zellen in frischem Medium auf. Man gab 1,5 µM $^{14}$C-Lysin (318 mCi/mmol) zu. Die Zellen wurden 12 Std. bei 37° C inkubiert und anschließend abzentrifugiert.
Nach dem Lyophilisieren des Überstandes löste man den Rest in 1,5 ml $H_2O$ und gab 5 ml Ethanol dazu. Der entstandene Niederschlag wurde verworfen. Den Überstand engte man am Rotationsverdampfer bis zur Trockene ein, nahm den Rest in 2,5 ml $H_2O$ auf und extrahierte dreimal mit 10 ml Ether. Die wässrige Phase wurde in der Papierchromatographie weiter aufgetrennt.
Im ersten System wurde als Fließmittel n-Butanol/Essigsäure/$H_2O$ 63:25:12 verwendet. Man erhielt zwei Peaks mit einem Rf-Wert von 0,4 und 0,49. Der schnellere Peak wurde mit $H_2O$ bidest. eluiert und nach Einengen des Eluats auf ein zweites System aufgetragen. In diesem System wurde Ammoniak/Ethanol/$H_2O$ 1:16:3 als Laufmittel verwendet. Man erhielt Radioaktivität am Auftragsort und bei Rf-Wert von 0,2. Die Aktivität bei Rf 0,2 wurde mit $H_2O$ eluiert. Man erhielt $^{14}$C-markiertes Aerobactin mit einer spezifischen Aktivität von 9 mCi/mmol.

2.23.2. $^{3}$H-Markierung

10 mg Aerobactin wurden in 10 ml 0,5N HCl gelöst und 20 Min. bei 94° C inkubiert. Die Reaktionslösung wurde tiefgefroren und lyophilisiert. Den Rückstand nahm man in 2,5 ml Pyridin auf und versetzte mit $^{3}$H-Acetanhydrid (25 mCi, 50 µmol). Die Reaktionslösung stand über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden 10 µl nichtmarkiertes Acetanhydrid zugegeben. Nach 3 Std. setzte man 8 ml 4N $NH_4OH$ zu und engte nach weiteren 3 Std. am Rotationsverdampfer ein. Den Rückstand nahm man in 1 ml $FeCl_3$-Lösung (5 mg/ml) auf. Die Lösung färbte sich intensiv orangerot. Die spezifische Aktivität des erhaltenen Produkts betrug 80 mCi/mmol. Es lief in 3 DC-Systemen wie nichtmarkiertes Aerobactin.
Wachstumsstimulierung mit Fe-$^{3}$H-Aerobactin und Transportexperimente mit $^{55}$Fe-$^{3}$H-Aerobactin verliefen wie Kontrollversuche mit nichtmarkiertem Chelator.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Überprüfung der Funktion von fhuA bei der Eisenaufnahme über Aerobactin

Es gab Hinweise dafür, daß möglicherweise das FhuA Protein mit dem Chloacin-Rezeptor in der äußeren Membran zusammenarbeiten muß, um eine wirkungsvolle Eisenaufnahme über das Aerobactinsystem zu erhalten. Man konjugierte das Plasmid ColV-K30 aus dem Stamm KH576 in dem Stamm 1422, der von E.coli K-12 AB2847 abgeleitet war. Von diesen Zellen (BR691) isolierte man eine fhuA Mutante (BR692) und eine Cloacin resistente Mutante (BR694). Untersuchte man bei diesen Stämmen das Wachstumsverhalten auf Eisenmangelplatten mit Ferrichrom bzw. Aerobactin als einziger Eisenquelle, erhielt man folgendes Ergebnis (siehe Tabelle 1):
BR691 konnte, wie erwartet, Ferrichrom und Aerobactin als Eisenquelle nutzen. BR694 zeigte kein Wachstum mit Aerobactin, da sein Cloacin-Rezeptor in der äußeren Membran ausgefallen war. Der Stamm BR692 (fhuA) sollte einen intakten Rezeptor für Cloacin besitzen - er war Cloacin sensitiv - und deshalb mit Aerobactin als einziger Eisenquelle wachsen können. Die Zellen verwerteten aber das zugegebene Aerobactin nicht als Eisenquelle. Es schien so, als benötigten die Zellen gleichzeitig neben dem Cloacin-Rezeptor einen intakten Ferrichrom-Rezeptor, dessen Ausfall sich auch dadurch anzeigte, daß Ferrichrom nicht mehr als Eisenquelle angenommen wurde. (Diese Versuche wurden von Prof. Dr. Braun durchgeführt).
Für die Ergebnisse waren als Erklärungsmöglichkeiten denkbar:

a) Das FhuA Protein beeinflußte die Eisenaufnahme über den Cloacin-Rezeptor, ohne selbst direkt die Eisenaufnahme durchzuführen.

b) Die Mutation in fhuA des Stammes BR692 zeigte einen polaren Effekt und wirkte sich bis ins fhuB Gen aus.

Tabelle 1: Wachstum der Stämme BR691, BR692 und BR694 mit Aerobactin bzw. Ferrichrom als einziger Eisenquelle; Sensitivität gegen Cloacin

| | Einzige Eisenquelle | | Sensitivität |
|---|---|---|---|
| | Ferrichrom | Aerobactin | gegen Cloacin |
| BR691 | + | + | s |
| BR692 ($clo^R$) | + | - | r |
| BR692 (fhuA) | - | - | s |

\+ Wachstumshof um Filterrondellen
\- kein Wachstumshof
s sensitiv
r restistent

### 3.1.1. Eisenaufnahme über Ferrichrom und Ferri-Aerobactin bei BR691, BR692 (fhuA) und BR694 ($clo^R$)

Es war bekannt, daß fhuA Mutanten nach Pronasebehandlung wieder Eisenaufnahme über das Ferrichromsystem zeigten, während fhuB Mutanten durch Pronase im Eisen-Ferrichromtransport nicht verändert wurden (121).
Ein polarer Effekt der Mutation bei BR692 auf fhuB sollte unter Ausnutzung dieses Verhaltens leicht festzustellen sein. Würde der Eisentransport über Ferrichrom beim Stamm BR692 nach Pronasebehandlung wiederhergestellt, sollte die fhuA Mutation keine polare Wirkung auf fhuB aufweisen.
Zeigte die Pronasebehandlung jedoch keine Wirkung, mußte ein polarer Effekt der Mutation in fhuA auf fhuB angenommen werden.
Die Ergebnisse des Eisentransportversuches nach Pronasebehandlung konnten mit dem Stamm P8 (fhuA) und KL79 (fhuB) reproduziert werden (121). P8 zeigte keine Eisenaufnahme über das Ferrichromsystem. Behandelte man die Zellen vor dem Transportexperiment mit Pronase, konnte die Eisenaufnahme

über Ferrichrom gesteigert werden. Mit Eisen aus Aerobactin zeigte sich nach Pronasebehandlung keine Wirkung. Der Stamm KL79 (fhuB) konnte durch Pronasebehandlung nicht beeinflußt werden. (Siehe Abb. 1)

Die Eisenaufnahme des Stammes BR691 über Ferrichrom erfolgte sehr rasch. Bereits nach weniger als 5 Min. war ein Maximum erreicht. Die Eisenaufnahme über Aerobactin verlief dagegen langsamer, dafür kontinuierlich über den gemessenen Zeitraum. (Abb. 4)

Stamm BR694 ($clo^R$) nahm kein Eisen über das Aerobactinsystem auf, während die Eisenaufnahme über Ferrichrom wie bei Stamm BR691 verlief. (Abb. 4)

Stamm BR692 transportierte kein Eisen über Aerobactin, obwohl ein intakter Cloacin-Rezeptor vorhanden war. (Abb. 3) Erwartungsgemäß leistete auch das Ferrichromsystem keinen Beitrag zur Eisenaufnahme, da dieser Stamm keinen FhuA Rezeptor besaß. Man fand aber bei diesem Stamm auch nach Pronasebehandlung keine gesteigerte Eisenaufnahme über Ferrichrom. Dies wurde als Anhaltspunkt dafür gewertet, daß ein polarer Effekt der fhuA Mutation auf fhuB vorlag, und deshalb kein Eisentransport über Aerobactin bei BR692 erfolgen konnte. (Abb. 1)

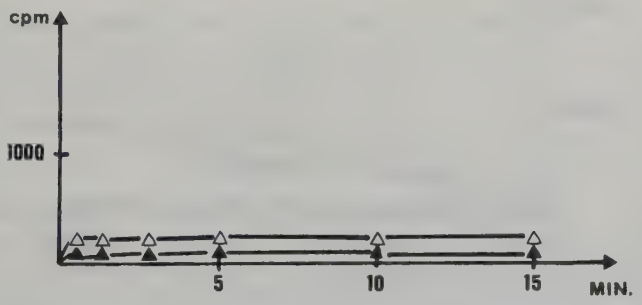


Abb. 1: $^{55}Fe$-Transport bei BR692 (fhuA) über Ferrichrom
△ Zellen ohne Pronase behandelt
▲ Zellen mit Pronase behandelt
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}Fe$; 0,15 µM Ferrichrom

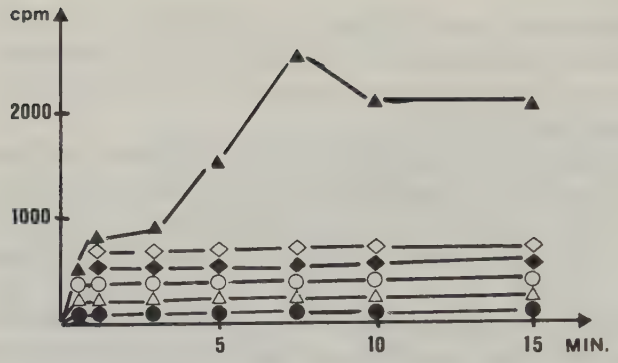


Abb. 2: Eisentransport bei Stamm P8 (fhuA) und KL79 (fhuB)
Die Zellen wurden ohne Pronasebehandlung (offene Symbole) oder nach Pronasebehandlung in Transportversuche eingesetzt.
▲ △ Ferrichrom/P8
● ○ Aerobactin/P8
◆ ◇ Ferrichrom/KL79
Konzentrationen: $^{55}$Fe 0,1 µM
Eisenchelatoren 0,15 µM

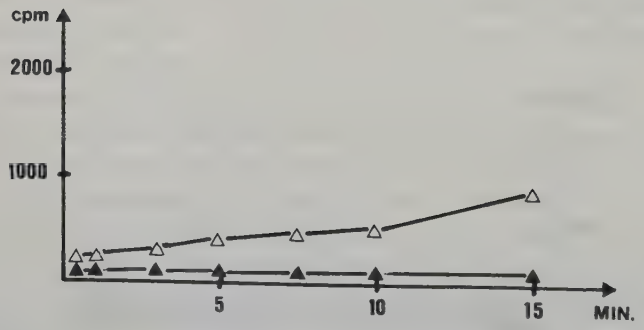


Abb. 3: $^{55}$Fe-Transport über Aerobactin bei BR692 (fhuA)
△ Zellen ohne Pronase behandelt
▲ Zellen mit Pronase behandelt
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}$Fe; 0,15 µM Aerobactin

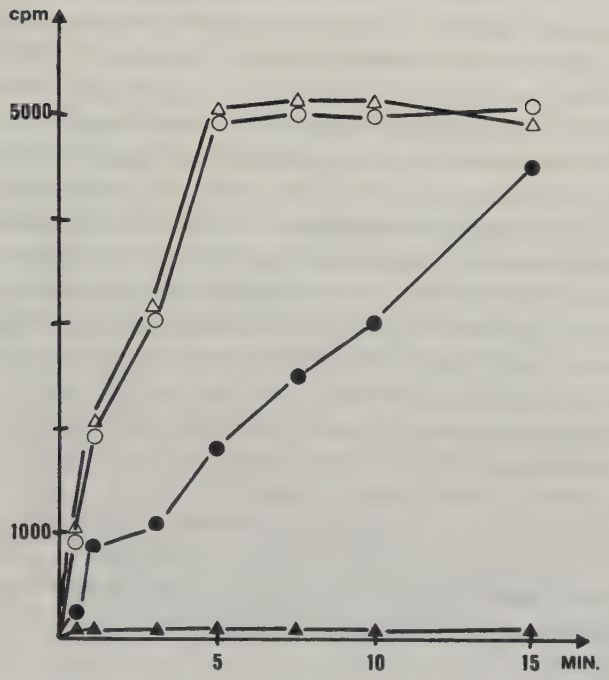


Abb. 4: Eisenaufnahme über Ferrichrom und Aerobactin bei BR691 (○ ●) und BR694 (clo$^R$) (△ ▲)
offene Symbole Ferrichrom
geschlossene Symbole Aerobactin
Konzentrationen: $^{55}$Fe 0,1 µM
Ferrichrom 0,15 µM
Aerobactin 0,15 µM

### 3.1.2. Übertragung eines ColV-Plasmids in fhuA Stämme

Durch entsprechend konstruierte Stämme war beabsichtigt, weitere Anhaltspunkte zu finden, ob das FhuA Protein an der Eisenaufnahme über Aerobactin beteiligt ist. Als fhuA Hintergrund wurde einmal der Stamm P8 gewählt, da man von ihm annahm, daß sich die Mutation in fhuA nicht auf fhuB auswirkt. Als zweiter fhuA Stamm neben P8 wurde AN193 als Rezipient verwendet. Von den fhuA Stämmen wurden streptomycinresistente Zellen isoliert, um gegen den Donor selektieren zu können. Als Donoren für das ColV-Plasmid ColV-K311 verwendete man die Stämme K311 und K311/1130. Der Stamm K311/1130 trug ein Tn5 Element auf dem Plasmid, das die Zellen resistent gegen Neomycin machte. Die fhuA Stämme wurden im Konjugationsansatz mit Neomycin oder unter Eisenmangelbedingungen selektiert. Aus den Konjugationsansätzen 311xP8 (SC101), 311/1130xP8 (SC104), 311xAN193 (SC107) und 1130xAN193 (SC110) wurden aus durchschnittlich 100 Kolonien pro Platte 3 Kolonien isoliert. Die vorliegenden Untersuchungen wurden jeweils mit einem Vertreter jeder Gruppe durchgeführt. Die isolierten Stämme produzierten alle Colicin V (siehe Tabelle 2).

### 3.1.3. $^{55}$Fe-Aufnahme über Ferrichrom und Ferri-Aerobactin

Abb. 6 zeigt die Eisentransportkurve der Stämme K311 und K311/1130 über Ferrichrom und Aerobactin. Beide Stämme nahmen Eisen über Ferrichrom sehr viel besser auf als über Aerobactin. Da der fhuA Stamm P8 kein funktionierendes Eisenaufnahmesystem über Ferrichrom besitzt, hätte man erwartet, daß die konjugierten Stämme SC101 und SC104, die ein ColV-Plasmid vor dem P8 Hintergrund besitzen sollten, kein Eisen über Ferrichrom aufnehmen könnten. Die Eisenversorgung über Aerobactin sollte mit diesen Stämmen in Abhängigkeit von fhuA getestet werden. Die Transportkurven der Stämme SC101

und SC104 für Ferrichrom zeigten eine Eisenaufnahmerate in derselben Höhe wie ein Stamm mit intaktem FhuA Protein. Der Eisentransport über Aerobactin verlief in SC101 und SC104 ähnlich wie in den Kontrollstämmen K311 und K311/1130 (siehe Abb. 8, 9).
Die durchgeführte Pronasebehandlung bei Stamm SC104 vor den Transportversuchen führte zu einer Absenkung der Transportrate.
Stamm SC110 (vor AN193 Hintergrund) zeigte eine Eisentransportrate über Ferrichrom, die nicht auf eine fhuA Mutation schließen lassen würde (Abb. 7). Nur Stamm SC107 transportierte Eisen lediglich über das Aerobactinsystem (Abb. 5). Wie könnte man diese Ergebnisse erklären?

a) Der Aerobactin Rezeptor stellte in Kooperation mit einer Rest-FhuA Funktion in den fhuA Mutanten die Eisenaufnahme über das Ferrichromsystem wieder her.

b) Die Übertragung genetischer Information erfolgte anstatt von K311 und K311/1130 auf P8 und AN193 in umgekehrter Richtung.

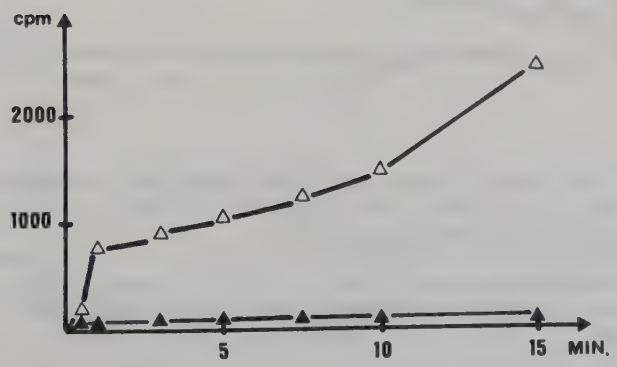


Abb. 5: $^{55}$Fe-Eisentransport bei SC107 über Aerobactin (△) und Ferrichrom (▲)
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}$Fe, 0,15 µM Ferrichrom, 0,15 µM Aerobactin

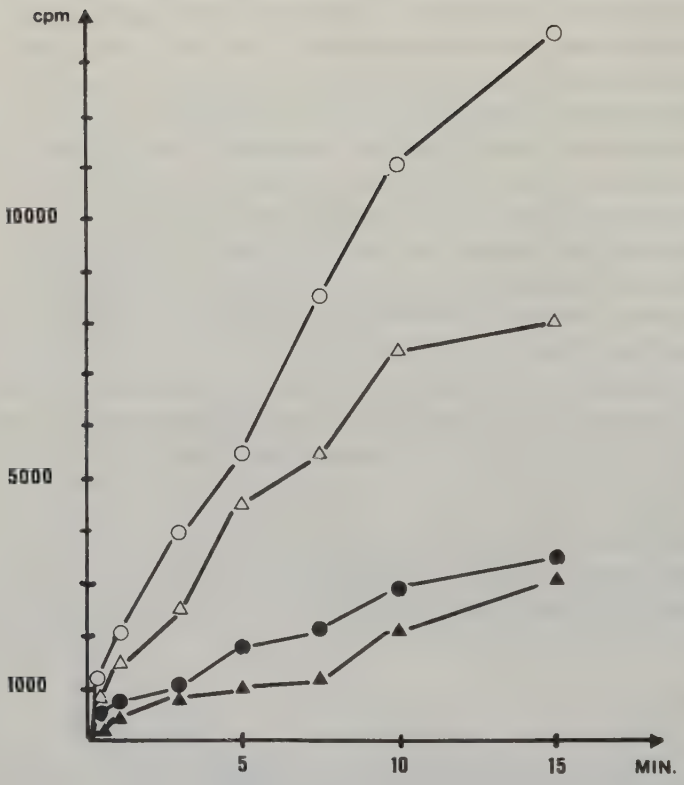


Abb. 6: $^{55}$Fe-Eisenaufnahme über Ferrichrom und Aerobactin bei K311 ( ○ ● ) und K311/1130 ( △ ▲ )
offene Symbole Ferrichrom
geschlossene Symbole Aerobactin
Konzentrationen: $^{55}$Fe 0,1 µM
Ferrichrom 0,15 µM
Aerobactin 0,15 µM

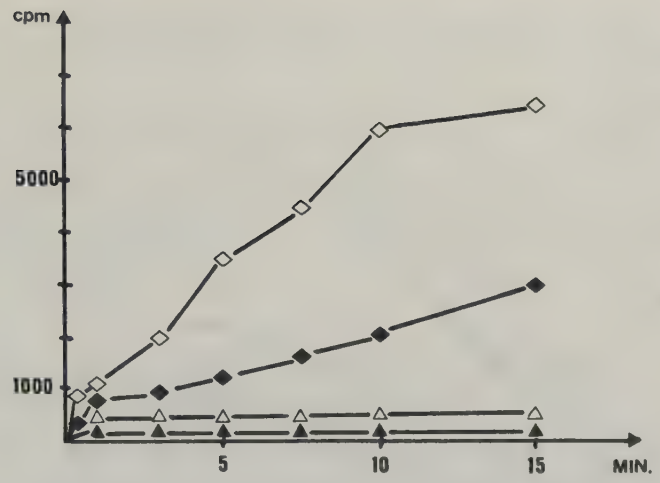


Abb. 7: $^{55}$Fe-Eisenaufnahme über Ferrichrom und Aerobactin bei SC110 (◇ ◆) und AN193 (△ ▲)
offene Symbole Ferrichrom
geschlossene Symbole Aerobactin
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}$Fe, 0,15 µM Aerobactin, 0,15 µM Ferrichrom

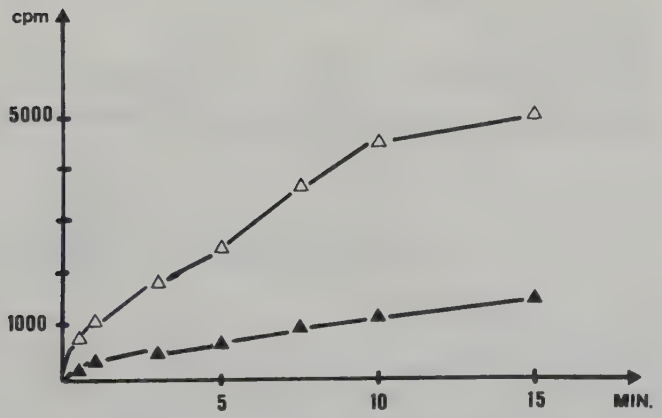


Abb. 8: $^{55}$Fe-Eisentransportrate bei Stamm SC101 über Ferrichrom(△) und Aerobactin(▲)
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}$Fe, 0,15 µM Aerobactin, 0,15 µM Ferrichrom

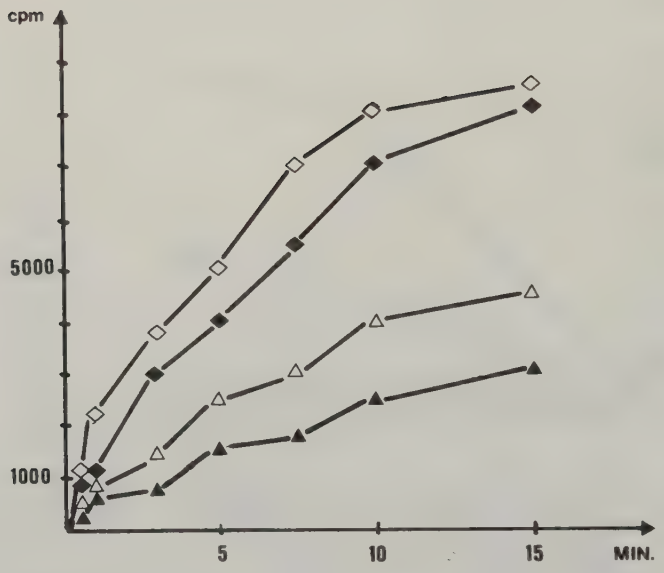


Abb. 9: $^{55}$Fe-Eisentransport bei SC104
◆◇ Ferrichrom
▲△ Aerobactin
offene Symbole: mit Pronase behandelt
geschlossene Symbole: ohne Pronase behandelt
Konzentrationen: 0,1 µM $^{55}$Fe, 0,15 µM Ferrichrom,
0,15 µM Aerobactin

### 3.1.4. Hemmversuche mit $T_1$, $T_5$, Colicin M und Albomyzin

Hemmversuche mit den Phagen $T_1$ und $T_5$, dem Colicin M und Albomycin bestätigten die Transportversuche. Die Stämme SC101, SC104 und SC110 verhielten sich so, als wäre ein intaktes FhuA Protein in der äußeren Membran vorhanden. Nur Stamm SC107 blieb resistent gegen die eingesetzten Hemmstoffe (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Wachstumshemmung mit $T_1$, $T_5$, Colicin M und Albomyzin
Produktion von Colicin V

| | $T_1$ | $T_5$ | Colicin M | Albomyzin | Colicin V-Produktion |
|---|---|---|---|---|---|
| SC101 | r | (s) | r | s | + |
| SC104 | r | (s) | r | s | + |
| SC107 | r | r | r | r | + |
| SC110 | r | s | s | s | + |
| P8 | r | r | r | r | - |
| AN193 | r | r | r | r | - |
| K311 | r | (s) | (s) | s | + |
| K311/1130 | (s) | s | s | s | + |

r resistent
s sensitiv
\+ Colicin V wird produziert
\- Colicin V wird nicht produziert

### 3.1.5. Elektrophoretische Untersuchungen der äußeren Membranen der Stämme SC101, SC104, SC107, SC110

Die gelelektrophoretische Untersuchung der äußeren Membranen sollte zeigen, welcher Stamm der eigentliche Rezipient bei den durchgeführten Konjugationen war. Wildtypstämme zeigen in der Gelelektrophorese im höhermolekularen Bereich aufgrund der vollständigen Struktur von Lipopolysacchariden gewellte Banden (K-12 Stämme sind Rauformen). Da K311 und K311/1130 Wildtypisolate sind, konnten sie von den K-12 Stämmen P8 und AN193 wegen ihrer gewellten Banden unterschieden werden. Die Auswertung der Gelelektrophoresen der äußeren Membranen zeigte, daß die Stämme SC101, SC104 und SC110 gewellte Banden besaßen (siehe Abb. 10). Bei diesen Stämmen erfolgte eine Übertragung der Information für Streptomycinresistenz aus dem Stamm P8 bzw. AN193 in K311 bzw. K311/1130. Die Übertragungsrichtung verlief in umgekehrter Richtung wie angenommen. Nur Stamm SC107 zeigte ein Bandenmuster, das dem von AN193 entspricht.

Die gewünschte Übertragungsrichtung erhielt man, wenn die Selektion der Konjuganten auf Eisenmangelplatten und Streptomycin durchgeführt wurde, wie im Falle der Stämme SC107 und BR691. Die Übertragung des Genmaterials von P8 bzw. AN193 auf die vermeintlichen Donorstämme erfolgte dagegen, wenn auf die Resistenzen gegen Neomycin und Streptomyzin unter nicht eisenlimitierten Wachstumsbedingungen selektiert wurde. Bei Konjugationen, durchgeführt mit einem Abkömmling von AB2847, ist zu beachten, daß dieser möglicherweise einen versteckten F'-Faktor trägt, der abhängig von den Wachstumsbedingungen aktiviert werden kann und unter diesen Bedingungen zu erfolgreichen Genübertragungen auch auf Stämme führt, die ihrerseits einen Übertragungsfaktor auf einem ColV-Plasmid tragen.

Die Untersuchungen zur Wechselwirkung des FhuA Rezeptors mit dem Cloacin-Rezeptor bei der Eisenaufnahme über Aerobactin ergaben, daß keine Kooperation zwischen diesen Proteinen der äußeren Membran stattfand. Die Mutation in fhuA bei Stamm

BR692 wirkte sich vermutlich, wie die Experimente mit Pronase zeigten, polar auf das fhuB Gen aus, so daß deshalb kein Eisentransport über Aerobactin in diesem Stamm erfolgte. Ein fhuA Stamm mit einem ColV-Plasmid (SC107) zeigte normalen Eisentransport über Aerobactin. Auch mit Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, daß fhuA nicht an der Aerobactinaufnahme beteiligt ist (16).

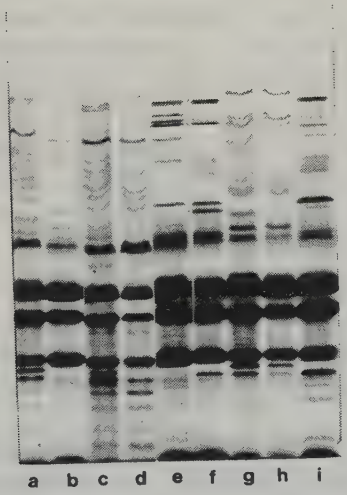


Abb. 10: PAGE der äußeren Membranen von
a SC110
b SC107
c SC104
d SC101
e AN193
f P8
g K311/1130
h K311
i AB2847

## 3.2. Ferrichrommodifizierung

### 3.2.1 Einfluß von Acetyl-P

Neben NADH wurde für die Modifizierung des Ferrichroms Acetyl-P als weiterer Cofaktor benötigt. Während allerdings die Reaktion ohne NADH nicht ablief, zeigte ein Versuch ohne zugesetztes Acetyl-P immer noch 25-30 % Umsatz. Das erreichbare Optimum im in vitro Ansatz lag bei etwa 60 % modifiziertem Ferrichrom bei einer Acetyl-P Konzentration von 20 mM. Der Prozentumsatzwert bezieht sich dabei auf die eingesetzte Ferrichromkonzentration. Da die Modifizierung vermutlich durch Acetylierung einer Hydroxamatgruppe des Ferrichroms erfolgt, lag die Vermutung nahe, daß Acetyl-P das Cosubstrat für diese Umsetzung darstellt. Ein Versuchsansatz ohne Acetyl-P würde nach dieser Voraussetzung immer noch genügend Substrat enthalten, um die Reaktion ablaufen zu lassen.
Behandelte man die Gesamtmembranfraktion mit EDTA (5 mM; pH 7,0), ließ sich ein Teil der modifizierenden Aktivität von der Membran ablösen. Auch hierbei förderte die Zugabe von Acetyl-P den Umsatz von Ferrichrom, eine Reaktion fand man aber auch hier, wenn kein Acetyl-P von außen zugesetzt wurde (siehe Tabelle 3a).
Wie die Tabelle zeigt, lag der Ferrichromumsatz in diesem System mit etwa 15 % sehr viel niedriger als im Testansatz mit Membranen, in dem 60 % Umsatz erreicht werden. Wahrscheinlich ging durch die Aufarbeitung ein großer Teil der Aktivität verloren.
Inkubierte man vor einem Experiment zur Ferrichrommodifizierung die Aktivität aus EDTA behandelten Membranen mit alkalischer Phosphatase, fand man ohne Zugabe von Acetyl-P kein modifiziertes Ferrichrom mehr. Dieses konnte erst wieder nachgewiesen werden, wenn 20 mM bzw. 50 mM Acetyl-P in den Testansatz zugegeben wurden (siehe Tabelle 3b). Die Daten sind ein weiteres Indiz dafür, daß Acetyl-P als Cosubstrat der Ferrichrommodifizierung verwendet wird.

Tabelle 3: Ferrichrommodifizierung in Abhängigkeit von Acetyl-P. Der modifizierende Faktor wurde durch EDTA-Behandlung von Membranen abgelöst. Die Proteinkonzentration betrug 400 µg/ml.
In allen Ansätzen lag 10 mM NADH vor.

a) Der Testansatz wurde nicht mit alkalischer Phosphatase vorinkubiert.

| Konzentration Acetyl-P | modiziziertes Ferrichrom |
|---|---|
| ohne AcP | 10 % |
| 20 mM AcP | 15 % |
| 50 mM AcP | 12 % |

b) Der Testansatz wurde mit alkalischer Phosphatase vorinkubiert (Proteinkonzentration an alkalischer Phosphatase 500 µg/ml; Inkubation 30 Min. bei 37° C; danach wurde vom Unlöslichen abzentrifugiert).

| Konzentration Acetyl-P | modifiziertes Ferrichrom |
|---|---|
| ohne AcP | 0 % |
| 20 mM AcP | 13 % |
| 50 mM AcP | 10 % |

### 3.2.2. Reduktion

Ferrichrom wurde nur dann modifiziert, wenn genügende Mengen an NADH im Ansatz vorhanden waren. Als optimal erwies sich dabei eine Konzentration von 10 mM. Dies entspricht einem 1000fachen Überschuß gegenüber 10 µM der eingesetzten Ferrichromkonzentration. Wird einem Testansatz zur Ferrichrommodifizierung mit Membranen kein NADH zugefügt, dann kann auch kein modifiziertes Ferrichrom nachgewiesen werden.

#### 3.2.2.1. NADH-Dehydrogenase, NADH-Oxidase

Es sollte geprüft werden, ob die NADH-Dehydrogenase oder die NADH-Oxidase an der Eisenfreisetzung aus dem Ferrichrom beteiligt sind. Sollte dies der Fall sein, würde man erwarten, daß Mutanten, die diese Enzyme nicht mehr funktionstüchtig synthetisieren können, keine Ferrichrommodifizierung mehr zustande bringen. Die Tabelle 4 zeigt, daß die Mutanten auch ohne diese reduzierenden Enzyme das Ferrichrommolekül modifizieren können.
Das Ausmaß der Reaktion lag bei der NADH-Oxidase-Mutante und deren Ausgangsstamm etwa auf derselben Höhe (31 % beim Wildtyp, 27 % bei der Mutante). Der Ausgangsstamm der NADH-Dehydrogenase-Mutante zeigte dagegen mit 39 % umgesetzten Ferrichroms eine deutlich höhere Umsatzrate als die Mutante mit 25 %. Dies ist aber nicht unbedingt ein Hinweis dafür, daß die NADH-Dehydrogenase an der Eisenreduktion bei der Ferrichrommodifizierung beteiligt ist. Möglicherweise wurden durch die Mutagenese in den mutierten Zellen in wesentlichen physiologischen Bereichen andere Rahmenbedingungen geschaffen, die eine verminderte Ferrichromumsetzung bedingten.
Die Ergebnisse zeigten auf jeden Fall nicht, daß eines der beiden Enzyme eine unentbehrliche Aufgabe bei der Ferrichrommodifizierung erfüllte. Man kann aber auch nicht ausschließe

daß die Enzyme bis zu einem gewissen Grade an der Eisenfreisetzung beteiligt sein könnten, vor allem wenn man annimmt, daß die Reduktion des Eisens auf alternativen Wegen erfolgen kann.

Tabelle 4: Ferrichrommodifizierung mit NADH-Dehydrogenase- und NADH-Oxidase-Mutanten
In einen Versuchsansatz wurden jeweils 1,5 mg Membranprotein eingesetzt.
(Ferrichrommodifizierung: in Prozent des eingesetzten Ferrichroms)

| | 20 mM NADH + 10 mM AcP | 20 mM NADH ohne AcP | ohne NADH 10 mM AcP |
|---|---|---|---|
| a) ymel (Wildtyp) | 31 | 25 | 0 |
| b) 487 NADH-Oxidase$^-$ abgeleitet von a) | 27 | 20 | 0 |
| c) Iyl3 (Wildtyp) | 39 | 20 | 0 |
| d) Iyl2 NADH-Dehydrogenase$^-$ (abgeleitet von c) | 25 | 20 | 0 |
| e) AB2847 | 53 | 26 | 0 |

### 3.2.2.2. Modifizierung von Desferri-Ferrichrom

Die Modifizierung von Desferri-Ferrichrom lieferte Informationen über die Aufgabe des NADH bei der Ferrichrommodifizierung. Wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, wurde Desferri-Ferrichrom im Gegensatz zu Ferrichrom auch ohne Anwesenheit von NADH im Testansatz modifiziert. NADH wird wohl zur Reduktion des Eisens verwendet. Reduziertes Eisen ist in der Lage, das Ferrichrommolekül zu verlassen. Die eigentliche Modifizierungsreaktion sollte nach den vorhandenen Daten am Desferri-Ferrichrom erfolgen.

Tabelle 5: Modifizierung von Desferri-Ferrichrom in Abhängigkeit von NADH
In allen Versuchsansätzen lag AcP mit 10 mM vor. Die eingesetzte Proteinmenge pro Experiment betrug 1,5 mg.
(Ferrichrommodifizierung: modifiziertes Ferrichrom in Prozent des eingesetzten Desferri-Ferrichroms bzw. Ferrichroms)

| | Desferri-Ferrichrom | Ferrichrom |
|---|---|---|
| 10 mM NADH | 38 | 55 |
| ohne NADH | 28 | 0 |

### 3.2.3. Ferrichrommodifizierung mit Mutanten in Ferrichrom-Aufnahmefunktionen

Die Eisenaufnahme über Ferrichrom benötigt einige Aufnahmefaktoren in der äußeren Membran und Cytoplasmamembran, die als potentielle Kandidaten für die Modifizierungskatalyse überprüft werden müssen. Als Rezeptor in der äußeren Membran dient das Produkt des Gens fhuA. Weitere Faktoren, die der Cytoplasmamembran zugeordnet werden, tragen die Bezeichnungen FhuB, C, D. Das Protein TonB der Cytoplasmamembran vermittelt möglicherweise eine Energieübertragung von der Cytoplasmamembran zum Rezeptorprotein in der äußeren Membran. Das Gen exbB codiert für einen Faktor, der die Eisenaufnahme über Ferrichrom und den Vitamin B12-Transport beeinflußt. Mit Gesamtmembranen von Mutanten in den verschiedenen Aufnahmefunktionen wurde nach Methode 2.7. untersucht, ob die Stämme die Ferrichrommodifizierungsreaktion durchführen können. Tabelle 6 gibt die Ergebnisse wieder. Die Umsetzungsaktivität lag mit etwa 60 % bei allen Mutanten in der Höhe des Kontrollstammes AB2847. Auch die Deletionsmutante FeTu93, mit einer Deletion von fhuBfhuD, zeigte keine verringerte Intensität

der Reaktion.
Die bezeichneten Gene können demnach nicht für die Ferrichrommodifizierung verantwortlich sein.

Tabelle 6: Ferrichrommodifizierung mit Membranen von Mutanten in Aufnahmefunktionen

| | Umgesetztes Ferrichrom in % |
|---|---|
| RK3944 (fhuA) | 59 |
| P8 (fhuA) | 62 |
| RK3931 (fhuB) | 63 |
| N12 (fhuC) | 58 |
| FeTu93 ( Δ fhuBC) | 61 |
| BR158 (tonB) | 61 |
| 1388 (exbB) | 58 |
| AB2847 | 60 |

### 3.2.4. Isolierung ferrichromsensitiver Mutanten

Eine intensive Untersuchung der Ferrichrommodifizierung in ihrer Funktion für die Zelle setzt voraus, daß Mutanten zur Verfügung stehen, denen dieser Funktionsbereich fehlt. Bei dem Versuch, Mutanten zu isolieren, die keine Ferrichrommodifizierung mehr durchführen konnten, ging man von der Arbeitshypothese aus, daß die Veränderung des Ferrichroms eine wesentliche Rolle spielt, um den Desferri-Liganden wieder aus der Zelle auszuscheiden. Der Ausfall der Ferrichrommodifizierungsfunktion sollte zur Folge haben, daß Ferrichrom bzw. Desferri-Ferrichrom in der Zelle angereichert wird. Da Desferri-Ferrichrom ein sehr starker Eisenkomplexbildner ist, sollte es in angereicherter Form in der Zelle in Wechselwirkung mit dem intrazellulären Eisenstoffwechsel treten und dort zu so starken Veränderungen führen, daß die Zelle

ihr Wachstum beenden oder stark einschränken muß.

3.2.4.1. Mutagenese mit MNNG

Zur Mutagenese wurde E.coli K-12 AB2847 verwendet. Nach den Methoden 2.15.1. und 2.16. wurden ungefähr 6000 Kolonien untersucht. Davon zeigten zwölf Kolonien gutes Wachstum auf Platten ohne Ferrichrom, dagegen kein Wachstum auf Platten mit 50 µM Ferrichrom. Diese Zellen wurden als ferrichromsensitive Mutanten angesehen.

3.2.4.1.1. Stabilität der Mutanten

Die Mutanten unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten stark vom Ausgangsstamm. Bereits nach zwei Wochen waren auf TY- und NB-Platten keine Überlebenden mehr zu finden, so daß man gezwungen war, die Zellen in kürzeren Abständen auf neue Platten zu überimpfen. Bei jedem Stamm lysierte ein Teil der Zellen auf Platten und in Submerskulturen bereits nach etwa 12-15 Std. Inkubation.
Die Mutanten blieben in der ursprünglich selektierten Eigenschaft nicht stabil. Von den zwölf isolierten Stämmen waren nach einer einzigen Plattenpassage nur noch fünf mit dem ursprünglichen Verhalten vorhanden. Acht Stämme dagegen zeigten gutes Wachstum auf Platten mit Ferrichrom. Die fünf stabil gebliebenen Stämme konnten zehn Passagen auf NB-Platten gehalten werden, bevor sie gleichfalls Veränderungen zeigten. Nach zehn Passagen waren noch zwei Stämme vorhanden, nach weiteren drei Passagen wuchsen alle Stämme auf NB-Platten mit Ferrichrom (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Wachstum der ferrichromsensitiven Mutanten auf NB-Agar Platten mit 50 µM Ferrichrom

Zeit in Wochen nach der Isolierung:

| | 0 Wochen | | 1 Woche | | 5 Wochen | | 11 Wochen | | 14 Wochen | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | NB | NB+Fch | NB | NB+Fch | NB | NB+Fch | NB | NB+Fch | NB | NB+Fch |
| FS44 | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| FS12 | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| FS40 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| FS25 | + | - | + | - | + | - | + | + | + | + |
| FS19 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | + |
| FS33 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS41 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS39 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS22 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS27 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS37 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| FS35 | + | - | + | + | + | + | | | | |
| AB2847 | + | - | + | + | + | + | | | | |

\+ Wachstum
\- kein Wachstum
Für die leer gebliebenen Tabellenplätze wurden keine Werte ermittelt

3.2.4.1.2. Nährstoffansprüche, aroB

Die Mutanten wurden auf Minimalmedium ausgestrichen, auf denen der Ausgangsstamm AB2847 wachsen konnte, um festzustellen, ob noch zusätzliche Nährstoffansprüche durch die Mutagenese erworben wurden. Als Minimalmedium wurde M631 und M9 verwendet. Alle isolierten Stämme waren fähig, auf den beiden Medium zu wachsen.
Der Ausgangsstamm AB2847 trägt die Mutation aroB, die es den Zellen nicht gestattet, Enterochelin zu produzieren. Alle isolierten Mutanten konnten sich nicht auf Minimalmedium ohne Aromatenzusätze vermehren. Sie waren also wie der Ausgangsstamm aroB (siehe Tabelle 8).

3.2.4.1.3. Verhalten gegen Hemmstoffe (Colicine, Phagen)

Die meisten Stämme waren schwach sensitiv gegen den Phagen $T_1$. Nur zwei Stämme erwiesen sich als resistent. Der Phage $T_5$ lysierte acht Stämme, wohingegen vier Stämme resistent blieben. Gegen die anderen Hemmagenzien, die FhuA als Rezeptor benötigen, waren die Zellen resistent. Bis auf einen schwach sensitiven Stamm waren alle resistent gegen das Antibiotikum Albomyzin. Das Colicin M zeigte keine Wirkung auf die isolierten Mutanten. Colicin B benötigt das Fep-Protein, den Enterochelin-Rezeptor, um erfolgreich in eine Zelle eindringen zu können. Die ferrichromsensitiven Mutanten waren ausnahmslos resistent gegen Colicin B.
Der Phage TuIa, der das Hauptprotein Ia als Rezeptor benutzt, konnte in keinem Fall die Zellen lysieren.
Gegen den Phagen TuII* waren acht Stämme resistent, während vier Stämme schwach sensitiv waren. Der Phage $T_4$ zeigte in drei Fällen einen schwachen Lysehof an, während neun Stämme resistent waren (siehe Tabelle 8).
Die Eigenschaften der äußeren Membran waren bei den isolier-

Tabelle 8: Verhalten der ferrichromsensitiven Mutanten gegen Hemmstoffe, die äußere Membranproteine als Rezeptoren benötigen; Wachstum auf Minimalmedium ohne Aromatenzusätze

| | $T_1$ | $T_5$ | Albo-mycin | Colicin M | Colicin B | TuIa | TuII* | $T_4$ | aroB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FS44 | (s) | (s) | r | r | r | r | r | r | - |
| FS12 | (s) | (s) | (s) | r | r | r | r | r | - |
| FS40 | (s) | (s) | r | r | r | r | r | (s) | - |
| FS25 | (s) | r | r | r | r | r | (s) | r | - |
| FS19 | (s) | (s) | r | r | r | r | r | r | - |
| FS33 | r | r | r | r | r | r | (s) | r | - |
| FS41 | (s) | (s) | r | r | r | r | r | r | - |
| FS33 | (s) | r | r | r | r | r | r | r | - |
| FS22 | r | r | r | r | r | r | (s) | (s) | - |
| FS27 | s | (s) | r | r | r | r | r | r | - |
| FS37 | (s) | (s) | r | r | r | r | (s) | (s) | - |
| FS35 | s | (s) | r | r | r | r | r | r | - |
| AB2847 | s | s | s | s | s | s | s | s | - |

r resistent (kein Lysehof)
s sensitiv (klarer Lysehof)
(s) schwach sensitiv (trüber Lysehof oder einzelne Lyseplaques)
- kein Wachstum auf Minimalmedium ohne Aromatenzusätze: aroB

ten Mutanten im Vergleich zum Ausgangsstamm verändert. Möglicherweise betraf die Mutation einen Faktor, der Struktur und Organisation der äußeren Membran beeinflußt.
Obwohl die isolierten Stämme in ihrem Verhalten sehr stark vom Ursprungsstamm abwichen, zeigten einige Eigenschaften an, daß sie von diesem abstammten:

a) Alle Mutanten brauchten zum Wachstum auf Minimalmedium Aromatenzusätze. Sie waren wie der Ausgangsstamm aroB.

b) Die Stämme waren in einem gewissen Ausmaß sensitiv gegen die verwendeten Hemmstoffe.

c) Ein ELISA-Test spezifisch auf Lipoprotein und Protein II*, durchgeführt mit den Mutanten FS25, FS44, FS40, FS19 und FS12 war positiv.

d) Der S100 der untersuchten Mutanten FS25, FS44, FS40, FS19 und FS12 spaltete Albomyzin. Die Stämme FS44 und FS12 zeigten dabei geringere Aktivität als die übrigen und der Kontrollstamm AB2847.

### 3.2.4.1.4. Verwertung von Ferrichrom als einziger Eisenquelle

Brachte man ferrichromsensitive Stämme in Weichagar auf NB-Platten, in denen 200 µM Bipyridin und 100 µM NTA das freie Eisen in komplexer Bindung für die Zellen unverwertbar machten, fand man um Filterrondellen mit aufpipettiertem Ferrichrom bei acht Stämmen Wachstumshöfe. Nur vier Stämme zeigten kein Wachstum. Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn den Stämmen auf den Filterrondellen anstatt Ferrichrom $FeCl_3$ angeboten wurde (siehe Tabelle 9).
Dabei gehörten sechs der acht Stämme, die gewachsen waren,

zu der Gruppe der Mutanten, die sich bereits nach einer Passage über NB-Platten wieder auf NB-Platten mit zugesetztem Ferrichrom vermehren konnten (siehe Tabelle 7, 9). Zwei der Stämme der stabilen Gruppe (FS12, FS25) zeigten gleichfalls Wachstum mit Ferrichrom, während die übrigen drei Stämme keine Wachstumshöfe ausbildeten (FS44; FS40, FS19). Nur ein Stamm der instabilen Gruppe konnte Ferrichrom als Eisenquelle nicht verwerten (FS27).

Tabelle 9: Wachstum mit Ferrichrom bzw. $FeCl_3$ als einziger Eisenquelle

| | Ferrichrom | $FeCl_3$ |
|---|---|---|
| FS44 | - | - |
| FS12 | + | (+) |
| FS40 | - | - |
| FS25 | + | (+) |
| FS19 | - | - |
| FS33 | + | (+) |
| FS41 | + | (+) |
| FS39 | + | (+) |
| FS22 | + | (+) |
| FS27 | - | - |
| FS37 | + | (+) |
| FS35 | + | (+) |
| AB2847 | + | + |

\+ deutlich sichtbarer Wachstumshof
(+) Wachstumshof ist schwächer ausgebildet
\- kein Wachstumshof erkennbar

3.2.4.1.5. Eisentransport über Ferrichrom

Nach Methode 2.6. wurde mit radioaktiv markiertem $^{55}$Fe-Ferrichrom die Eisentransportrate der Stämme FS19, FS40, FS12, FS25 und AB2847 bestimmt. Die Transportkurven in Abb. 11 zeigen, daß die Mutanten im Vergleich mit Kontrollstamm AB2847 kein Eisen über Ferrichrom aufnahmen.
Die Versuche von 3.2.4.1.3. mit Ferrichrom als einziger Eisenquelle stehen in gewissem Widerspruch zu diesen Daten, da mit zwei Stämmen, die keine Eisenaufnahme im Transportversuch zeigten, eine Wachstumsstimulierung mit Ferrichrom als einziger Eisenquelle möglich war (FS12, FS25). Bei den beiden Stämmen FS19 und FS40 stimmen die Daten aus Transportversuchen und Wachstumsstimulierung überein, da in keinem Fall Eisenaufnahme über Ferrichrom erfolgte. Möglicherweise verbesserte Ferrichrom für die Stämme FS12 und FS25 lediglich die Verfügbarkeit der freien Eisenkonzentration in den Platten ohne selbst den Eisentransport in die Zellen vorzunehmen. Man konnte aber bei diesen Stämmen auch damit rechnen, daß sich nach längerer Inkubation der aroB Marker veränderte, so daß Enterochelin ausgeschieden wurde.

3.2.4.1.6. Ferrichrommodifizierung

Mit Gesamtmembranfraktionen der Stämme FS40, FS25, FS12, FS19 und FS44 wurde nach Methode 2.7. geprüft, ob Ferrichrom von diesen Stämmen modifiziert werden konnte.
Es gelang nach Inkubation dieser Membranen mit Ferrichrom nicht, modifiziertes Ferrichrom nachzuweisen. Der Kontrollversuch mit AB2847 ergab eine Umsatzrate von etwa 60 % des eingesetzten Ferrichroms zu modifiziertem Ferrichrom.
Im Transportversuch konnte Eisen von keinem der untersuchten Stämme über Ferrichrom aufgenommen werden. Zwei Stämme (FS12, FS25) zeigten Wachstum mit Ferrichrom als einziger Eisen-

quelle.
Da die Rezeptoreigenschaften der äußeren Membran dieser Stämme bereits stark verändert sind, ergeben diese Daten keinen direkten Zusammenhang zwischen Eisenaufnahme über Ferrichrom und Modifizierung.

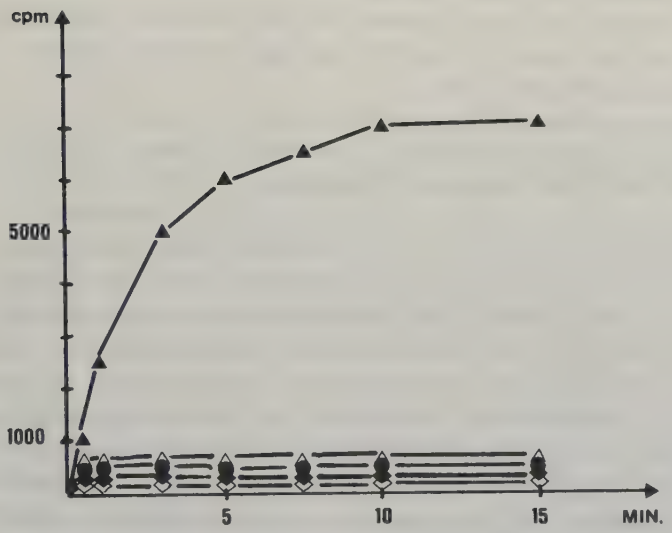


Abb. 11: $^{55}$Fe-Transport über Ferrichrom
Eisen: Ferrichrom 1:1,5
Konzentration: 0,1 µM $^{55}$Fe-Ferrichrom
▲ AB2847
◇ FS40
◆ FS19
● FS12
△ FS25

### 3.2.4.2. Mutagenese mit Tn10

Das Transposon Tn10 ist ein bewegliches DNA-Element, das an beliebiger Stelle eines Bakterienchromosoms inserieren kann. Das betroffene Gen verliert seine physiologische Funktion, weil es nicht mehr abgelesen werden kann. Das Tn10 Element ist leicht nachzuweisen, da es einen Tetrazyklinresistenz-Marker trägt. In die Zellen wird es eingeschleust mit Hilfe eines λ-Phagen, der eine Suppressormutation trägt. Zur Mutagenese wird ein Stamm verwendet, der $mal^+$ sein muß, damit der Phage adsorbieren kann.
Es wurde versucht mit Methode 2.15.2. und 2.16. durch Tn10-Mutagenese ferrichromsensitive Mutanten zu finden. Zur Mutagenese wurde E.coli K-12 H1367 verwendet.
Es sollte versucht werden, die Ergebnisse nach MNNG-Mutagenese (dargestellt in 3.2.4.1.1. bis 3.2.4.1.6.) zu reproduzieren. Da die Tn10-Mutagenese zum Ausfall des betroffenen Gens führt, während die MNNG-Mutagenese durch Punktmutationen zu funktionierenden oder teilweise funktionierenden Genprodukten führen kann, sollten die ferrichromsensitiven Stämme nach Tn10-Mutagenese einen besser zu definierenden Phänotyp zeigen. Die Tn10-Mutagenese bot außerdem den Vorteil, leichter eine Kartierung durchführen zu können, wenn Mutanten zu finden waren. Es wurden etwa 6000 Kolonien daraufhin untersucht, ob ihr Wachstum auf NB-Platten mit 50 µM Ferrichrom gehemmt würde. Man fand keine einzige Kolonie auf die das zutraf.
Vermutlich wurde durch die gewählten Selektionsbedingungen ein Gen betroffen, das sich bei Fehlen lethal auswirkt.

## 3.3. Aerobactinmodifizierung

Die Frage nach einer Aerobactinmodifizierung ergibt sich, wenn man die Gemeinsamkeiten der Transportwege über Ferri-

chrom und Aerobactin betrachtet. Beide Moleküle benötigen nach Durchtritt durch die äußere Membran über spezifische Rezeptoren dieselben Faktoren in der Cytoplasmamembran. Aerobactin gehört, wie Ferrichrom, zur Stoffklasse der Hydroxamate. Der Modifizierungsfaktor könnte nach Eisenfreisetzung die Hydroxamatgruppe erkennen und chemisch verändern. Im folgenden werden Versuche beschrieben, mit deren Hilfe nachgewiesen werden sollte, ob Aerobactin modifiziert wird.

### 3.3.1. Isolierung von Mutanten in der Aerobactinsynthese

Im Wachstums- und Transportverhalten von Zellen, denen Aerobactin von außen zugesetzt wird, sollte es möglich sein, zu erkennen, ob Aerobactin beim Eisentransport ähnlich wie Ferrichrom verändert wird. Die Veränderung sollte dazu führen, daß die wirksame Aerobactinkonzentration im Verlauf des Eisentransportes verringert wird. Um dies überprüfen zu können, mußten Mutanten isoliert werden, die selbst kein Aerobactin mehr produzieren konnten, dieses aber noch gut in die Zellen aufnahmen.
Zur Mutagenese wurde der Stamm EN775 verwendet, der ein Tn10 Element auf dem ColV-Plasmid trägt. Die Mutagenese wurde nach Methode 2.15.3. mit Hydroxylamin durchgeführt. Die mutagenisierten Zellen wurden dreimal in NB Medium mit 20 µg/ml Ampicillin bei einer $OD_{578}$ von 0,05 angereichert. Die $OD_{578}$ wurde so niedrig gehalten, um Kreuzfütterung der Mutanten durch intakte Zellen möglichst zu vermeiden. Die Selektion erfolgte auf NB-Platten mit 2 µM Aerobactin. Solche Zellen wurden als Mutanten angesehen, die nur noch auf Platten mit dem zugesetzten Aerobactin wachsen konnten. Man fand unter etwa 700 untersuchten Kolonien vier, die dieses Verhalten zeigten. Von den vier wuchs eine Kolonie noch schwach auf Platten ohne Aerobactin (AS112), während bei den übrigen

drei kein Wachstum zu erkennen war (AS445, AS521, AS505). Die vier Stämme waren sensitiv gegen Cloacin, die Phagen $T_1$, $T_5$, Colicin M und das Antibiotikum Albomyzin, alle produzierten Colicin V (siehe Tabelle 10). Sie konnten auf Eisenmangelplatten mit Ferrichrom oder Aerobactin als einziger Eisenquelle wachsen (siehe Tabelle 10). Die Aerobactinausscheidung wurde durch einen Kreuzfütterungstest überprüft. Die Stämme AS521, AS445 und AS505 konnten die jeweils anderen nicht kreuzfüttern, zeigten aber einen schwachen Wachstumshof, um Filterrondellen mit AS112 und einen deutlichen Wachstumshof um den Stamm AN775 (siehe Tabelle 11). Der Stamm AS112 wurde bei weiteren Untersuchungen ausgeklammert, da er noch schwach Aerobactin produzieren konnte, während die Stämme AS445, AS505 und AS521 als Mutanten im Aerobactinsynthesesystem angesehen wurden.

### 3.3.2. Transportversuche

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden durchgeführt, um herauszufinden, wie häufig das Aerobactinmolekül beim Eisentransport verwendet werden kann. Wenn Aerobactin in modifizierter Form nach der Eisenfreisetzung im Medium erscheint, dann sollte man eine Abnahme der wirksamen Ferri-Aerobactinkonzentration nachweisen können. Nach einem wie in Methode 2.6. durchgeführten Eisenaufnahmeexperiment wurden die Zellen abzentrifugiert. Mit dem Überstand wurden frische Zellen aufgenommen und erneut die Eisenaufnahme gemessen. Dieses Verfahren wiederholte man noch zweimal. Der verwendete Stamm (AS505) konnte zwar Eisen über Aerobactin transportieren, aber kein Aerobactin mehr synthetisieren.
Die Konzentration an Aerobactin wurde im Eisentransportversuch so gewählt, daß im Probeentnahmezeitraum von 15 Min. auf jeden Fall die theoretische Eisenaufnahmerate bei äquimolarer einmaliger Eisenaufnahme überschritten werden mußte.

Tabelle 10: Charakterisierung der Mutanten im Aerobactinsynthesesystem

| | $T_1$ | $T_5$ | Colicin M | Albo-myzin | Cloazin | Produktion von Colicin V | Einzige $Fe^{3+}$-Quelle | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | Fch | Ab |
| AS112 | s | s | s | s | s | + | + | + |
| AS445 | s | s | s | s | s | + | + | + |
| AS521 | s | s | s | s | s | + | + | + |
| AS505 | s | s | s | s | s | + | + | + |
| EN775 | s | s | s | s | s | + | +[a] | +[a] |

s sensitiv
+ ColV wird produziert; Wachstum auf Ferrichrom (Fch) bzw. Aerobactin (Ab)
a Hintergrundwachstum auf der ganzen Platte

Tabelle 11: Kreuzfütterung der Mutanten in der Aerobactinsynthese

| im Weichagar | Kreuzfütterung durch | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | AS112 | AS445 | AS521 | AS505 | EN775 |
| AS112 | a | a | a | a | a |
| AS521 | (+) | - | - | - | + |
| AS505 | (+) | - | - | - | + |
| AS445 | (+) | - | - | - | + |

+ Wachstumshof um Filterrondelle
- kein Wachstumshof
a Hintergrundwachstum auf der ganzen Platte

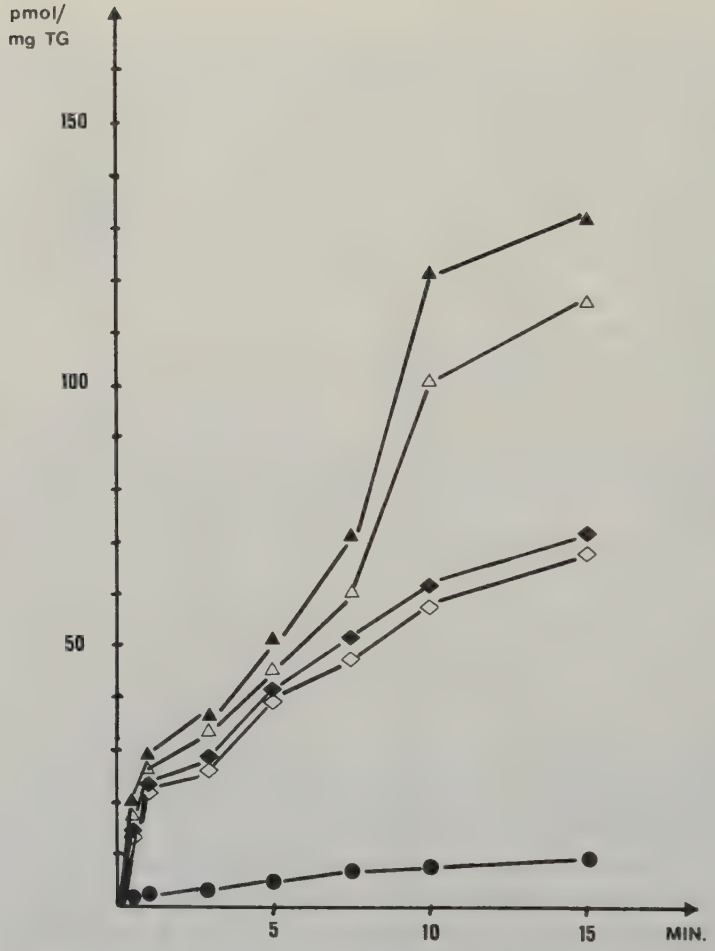


Abb. 12: Mehrfacher Eisentransport über Aerobactin mit AS505
Nach einem Eisenaufnahmeexperiment (Kontrolle) wurden die Zellen abzentrifugiert und mit dem Überstand neue Zellen aufgenommen.
Konzentrationen: 0,01 µM Aerobactin, 0,5 µM $^{55}Fe^{3+}$, 100 µM NTA, 0,4 % Glucose
Eisenaufnahmewerte aus Kontrollansätzen mit 0,5 µM $^{55}Fe^{3+}$ ohne Aerobactin wurden abgezogen.
Theoretische Transportkapazität: 52,6 pmol/mg TG

▲ Kontrolle
△ Überstand einmal mit Zellen vorinkubiert
◆ Überstand zweimal mit Zellen vorinkubiert
◇ Überstand dreimal mit Zellen vorinkubiert
● 1,0 µM Fe-$^{3}$H-Aerobactin

Sie betrug bei den verwendeten 0,01 µM Aerobactin 52 pmol/mg TG bei einer $OD_{578}$ von 0,5. Eisen wurde im 50fachen Überschuß angeboten.
Die Transportkurven in Abb. 12 zeigen, daß auch nach mehrmaliger Vorinkubation des Transportüberstandes mit Zellen eine Eisenmenge von frisch resuspendierten Bakterien aufgenommen wird, die über der theoretischen Aufnahmerate liegt. Die Ergebnisse weisen somit auf keine Erschöpfung der wirksamen Aerobactinkonzentration hin. Um die erfaßte Eisenmenge in die Zelle aufzunehmen, mußte ein Aerobactinmolekül vier- bis fünfmal in den Eisenaufnahmezyklus eingeschaltet werden. Ein Aufnahmeexperiment mit $^{3}$H-markiertem Aerobactin zeigte keine Aufnahme des Chelators in die Zellen. Die Eisenaufnahme über $^{3}$H-Aerobactin funktionierte normal.

### 3.3.3. Wachstumsstimulierung von Ferrichrom und Ferri-Aerobactin nach Vorinkubation

Modifiziertes Ferrichrom komplexiert Eisen etwa 100mal schlechter als Desferri-Ferrichrom. Vorinkubiertes Ferrichrom sollte demnach, wenn die Wachstumsstimulierung eines geeigneten Indikatorstammes getestet wird, umso kleinere Wachstumshöfe induzieren, je länger es vorinkubiert wurde. Würde Aerobactin im Verlauf der Eisenaufnahme wie Ferrichrom modifiziert, sollte die Wachstumsstimulierung eines Indikatorstammes gleichfalls schwächer werden. Um weitere Indizien hinsichtlich der chemischen Veränderung des Aerobactins im Verlauf des Eisentransportes zu erhalten, wurden von den skizzierten Überlegungen ausgehend, Versuche nach Methode 2.18. durchgeführt. Die Vorinkubation der Hydroxamate erfolgte mit Stamm AS505, der Aerobactin zwar aufnehmen, aber nicht mehr synthetisieren kann. Derselbe Stamm wurde als Indikator für Aerobactin und Ferrichrom in Eisenmangelplatten gewählt. Die Ausgangskonzentration der Chelatoren in den

Testansätzen betrug 100 µg/ml und 10 µg/ml. Tabelle 12 gibt die Ergebnisse wieder. Die Ferrichromkonzentration verringerte sich im Verlauf der Inkubation bis auf 30 % des Ausganswertes. Eine auf jeder Platte mitaufgelegte Filterrondelle mit 15 µl einer 100 µg/ml Ferrichromlösung ohne Bakterien, die gleich behandelt wurde wie die übrigen Testansätze zeigte keine Verringerung der Wachstumsstimulierung. Die Konzentration von Aerobactin änderte sich auch nach zehnständiger Vorinkubation nicht.

Tabelle 12: Konzentration von Ferrichrom und Ferri-Aerobactin nach Vorinkubation mit Stamm AS505. Angegeben ist die biologisch gemessene Konzentration des jeweiligen Chelators in µg/ml. Die Schwankungen bei Ferri-Aerobactin liegen im Bereich der Ablesegenauigkeit von 1 mm. Die Versuche wurden dreimal wiederholt.

| Vorinkubation (Std.) | Ferrichrom | | Ferri-Aerobactin | |
|---|---|---|---|---|
| | Ansatz a | Ansatz b | Ansatz a | Ansatz b |
| 0 | 100 | 10 | 100 | 10 |
| 2 | 70 | 7 | 100 | 10 |
| 4 | 50 | 5 | 100 | 15 |
| 7 | 30 | 5 | 70 | 10 |
| 10 | 30 | 3 | 100 | 10 |

### 3.3.4. Nachweis eines veränderten Aerobactinproduktes in verschiedenen DC-Systemen

Analog dem Vorgehen mit Ferrichrom zum Nachweis des modifizierten Produktes auf einem DC-System wurde versucht, ein modifiziertes Aerobactin nachzuweisen. Man inkubierte radioaktiv markiertes Aerobactin mit ganzen Zellen oder Membranen

und trug nach Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile den Überstand auf eine DC-Platte auf. Nach Entwicklung der Platte im Laufmittel wurde mit Hilfe des Scanners geprüft, an welchen Stellen auf der Platte Aktivität zu finden war. Die Untersuchungen mit ganzen Zellen wurden mit dem Stamm EN775 durchgeführt.
Für in vitro Versuche mit Membranen wurden Gesamtmembranfraktionen der Stämme AB2847, EN775 und a19 verwendet. Die Experimente wurden unter denselben Bedingungen und mit denselben Cosubstraten durchgeführt wie unter 2.7. für die Ferrichrommodifizierung beschrieben. Der Gesamtansatz wurde dabei auf 50 µl reduziert. Die abzentrifugierten Überstände wurden vollständig auf DC-Platten aufgetragen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tabelle 13, 14 aufgelistet.

Weder mit ganzen Zellen noch mit Membranen konnte in den verwendeten DC-Systemen ein modifiziertes Aerobactinmolekül nachgewiesen werden. Die Rf-Werte, bei denen Radioaktivität zu finden war, stimmten überein mit den Werten für Ferri-Aerobactin, die in Vorversuchen ermittelt wurden. Ferri-Aerobactin und Aerobactin liefen jeweils auf den DC-Systemen Cellulose mit n-Butanol/Essigsäure/$H_2O$ 60:15:25 und Cellulose mit Methanol/$H_2O$ 1:1 mit demselben Rf-Wert. Im System Kieselgel mit Methanol/$H_2O$ 1:1 hatte Aerobactin einen Rf-Wert von 0,68, während Ferri-Aerobactin einen Rf-Wert von 0,73 zeigte. In diesem System lag also eine ähnliche Situation vor, wie im System Chloroform/Methanol/$H_2O$ 65:25:4, das zum Nachweis des modifizierten Ferrichroms verwendet wurde. Auch hier liefen Desferri-Ferrichrom und Ferrichrom mit unterschiedlichen Rf-Werten. Dabei zeigte das modifizierte Ferrichrom denselben Rf-Wert wie Desferri-Ferrichrom.
Die eisenfreie Form des Ferrichroms, die im modifizierten Produkt praktisch eingefroren wird, lief in diesem System wohl aufgrund geänderter Konfiguration und Ladungsunterschieden in anderer Weise als Ferrichrom. Wollte man diese Betrachtung für Ferrichrom in analoger Weise auf Aerobactin übertragen, dann sollte noch am ehesten im System Kieselgel

mit Methanol/$H_2O$ 1:1 ein modifiziertes Molekül zu finden sein. Um den Nachweis von Aerobactin als Fehlerquelle auszuschließen, wurde ein Überschuß an Eisen zugegeben.

Tabelle 13: Versuch zur Aerobactinmodifizierung mit ganzen Zellen
Verwendeter Stamm: EN775, $OD_{578}$ zu Beginn 0,5
1,0 µM $^{14}C$-Ferri-Aerobactin ohne weitere Cosubstrate. In die Tabelle wurden die Rf-Werte eingetragen, bei denen Radioaktivität nachzuweisen war. Die Werte stimmen überein mit den Rf-Werten, die für Aerobactin in den betreffenden Systemen in Vorversuchen ermittelt wurden.

Radioaktivität, die in geringen Mengen in allen Fällen am Startfleck auftrat, wurde nicht berücksichtigt.

| Inkubationszeit | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|
| 0,5 Std. | 0,5 | 0,73 | 0,89 |
| 1 Std. | | | |
| 2 Std. | | | |
| 4 Std. | | | |
| 10 Std. | | | |

1 Cellulose mit n-Butanol-Essigsäure-$H_2O$ 60:15:25

2 Kieselgel mit Methanol-$H_2O$ 1:1

3 Cellulose mit Methanol-$H_2O$ 1:1

Tabelle 14: Versuch zur Aerobactinmodifizierung mit Membranen
Konzentrationen: 10 µM $^{14}$C-Ferrichrom, 20 mM Acetyl-P, 10 mM NADH

| Inkubationszeit | 1 | | | 2 | | | 3 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Ab2847 | EN775 | a19 | AB2847 | EN775 | a19 | AB2847 | EN775 | a19 |
| 2 Std. | in allen Fällen trat | | | in allen Fällen trat | | | in allen Fällen trat | | |
| 4 Std. | Aktivität nur bei | | | Aktivität nur bei | | | Aktivität nur bei | | |
| 10 Std. | einem Rf-Wert von | | | einem Rf-Wert von | | | einem Rf-Wert von | | |
| 24 Std. | 0,5 auf | | | 0,73 auf | | | 0,89 auf | | |

1 Cellulose mit n-Butanol-Essigsäure-$H_2O$ 60:15:25
2 Kieselgel mit Methanol-$H_2O$ 1:1
3 Cellulose mit Methanol-$H_2O$ 1:1

### 3.4. Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin mit Membranen

Eine membrankatalysierte Eisenreduktion aus Ferrichrom bzw. Ferri-Aerobactin ist umständlich nachzuweisen, da das Eisen der zugegebenen Membran mit dem $Fe^{2+}$-Indikator (BPS) eine starke Hintergrundreaktion verursacht.
Gibt man Ferrichrom bzw. Ferri-Aerobactin mit radioaktiv markiertem Eisen in einen entsprechenden Testansatz, kann das Eisen aus den Chelatoren recht einfach vom Eisen aus den Membranen unterschieden werden. In der Versuchsdurchführung nach Methode 2.22. wurde nur solches Eisen erfaßt, das vorher mit Ferrichrom bzw. Ferri-Aerobactin in das Experiment eingebracht wurde.
Tabelle 15 zeigt die Ergebnisse aus den Versuchen, in denen eine membranunterstützte Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin in Abhängigkeit von NADH untersucht wurde. Verwendet wurden Gesamtmembranen der Stämme AB2847 und EN775. Die Proteinkonzentration pro Ansatz betrug etwa 750 µ
Reduktion des Eisens aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin erfolgte nur, wenn ausreichende Mengen an NADH in den Testansatz gegeben wurden. Man fand mit zunehmender Inkubationsdauer eine größere Menge an reduziertem Eisen. Überraschend ist allerdings, daß das Ausmaß der Eisenreduktion im Versuch ohne zugesetzte Membranen gleich hoch war wie mit Membranunterstützung.
NADH reduzierte bis zu einem bestimmten Grad das Eisen aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin von der dreiwertigen zur zweiwertigen Form. Eine Katalyse der Eisenreduktion durch Membranen konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 15: Eisenreduktion aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin
Die Zahlen geben die Prozentwerte des reduzierten Eisens an

Ferrichrom

| | NADH | Inkubationszeit | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 15 Min. | 30 Min. | 240 Min. |
| ohne Membranen | 2 mM | 15 | 16 | 27 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 15 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |
| Membranen von AB2847 | 2 mM | 14 | 17 | 25 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 13 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |
| Membranen von EN775 | 2 mM | 17 | 18 | 23 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 0 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |

Ferri-Aerobactin

| | NADH | Inkubationszeit | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 15 Min. | 30 Min. | 240 Min. |
| ohne Membranen | 2 mM | 15 | 19 | 23 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 15 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |
| Membranen von AB2847 | 2 mM | 15 | 19 | 20 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 14 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |
| Membranen von EN775 | 2 mM | 13 | 17 | 23 |
| | 200 µM | 0 | 0 | 17 |
| | ohne | 0 | 0 | 0 |

# 4. DISKUSSION

## 4.1. fhuA: Eisentransport mit Ferri-Aerobactin

Untersucht man bei fhuA Mutanten die Eisenaufnahme aus Ferri-Aerobactin, findet man bei fast allen, daß sie Eisen aus diesem Chelator nicht zum Wachstum verwenden können. Dies führte zu der Vermutung, daß am ersten Schritt der Eisenverwertung aus Ferri-Aerobactin neben dem Cloacin-Rezeptor das FhuA Protein beteiligt sein könnte. Eisenaufnahmeversuche über Ferrichrom mit Pronase behandelten FhuA Stämmen und Komplementationsstudien mit Stämmen, die fhuA bzw. fhuB, C, D auf Plasmiden tragen, zeigten, daß sich eine Mutation im fhuA Gen meist polar auf die nachfolgende fhuB Genregion auswirkt. FhuA ist nicht an der Eisenaufnahme über Aerobactin beteiligt.
Die Hydroxamat-Eisenchelatoren Ferrichrom, Ferri-Aerobactin und Ferri-Coprogen benötigen jeweils einen eigenen Rezeptor in der äußeren Membran, während die Faktoren der Cytoplasmamembran, tonB, fhuB, C, D von allen erwähnten Eisenhydroxamaten gemeinsam benützt werden. Der Eisentransport über Hydroxamate zeigt hier eine Besonderheit, die ihn von fast allen anderen Stofftransporten unterscheidet. Während in der äußeren Membran jeweils ein spezifisches Rezeptorprotein arbeitet, laufen die Transportwege über die verschiedenen Chelatoren in der Cytoplasmamembran zusammen. Kleine hydrophile Moleküle passieren die äußere Membran über die sogenannten Porine, die durch die Hauptproteine Ia und Ib gebildet werden. Diese bilden Kanäle durch die äußere Membran von E.coli, durch die hydrophile Moleküle mit einem Molekulargewicht von 600-800 diffundieren können. Der Stofftransport über den periplasmatischen Raum bzw. die Cytoplasmamembran erfolgt über spezifische Bindeproteine und Transportsysteme. Ferrichrom mit einer Größe von 740 liegt etwa an der Grenze des Ausschlußvolumens der Porine, Ferri-Aerobactin mit einem Molekulargewicht von 620 sollte die Porinkanäle frei passieren

können. Die Chelatoren diffundieren, auch wenn sie in einer Konzentration von 0,1 mM entsprechenden Rezeptormutanten angeboten werden, nicht durch die Porine. Die gegebene Menge würde im Falle einer Aminosäure ausreichen, um einen auxotrophen Stamm zum Wachstum anzuregen. Weshalb die Eisenchelatoren auch nicht in höherer Konzentration durch die Porinkanäle diffundieren, ist noch ungeklärt.

Welche Gründe könnte es geben, daß die Eisenaufnahme über die Hydroxamate mit einem spezifischen Schritt in der äußeren Membran beginnt, dann aber über Faktoren in der Cytoplasmamembran weitergeführt wird, die verschiedene Moleküle als Substrat annehmen. Obwohl hierüber noch keine genauen Vorstellungen bestehen, sind einige Überlegungen dazu möglich. Die Hydroxamate, die als Eisenchelatoren verwendet werden können, unterscheiden sich nach Konformation, Größe und Ladung beträchtlich voneinander. Übereinstimmende oder zumindest ähnliche räumliche Strukturen sollten jeweils nur im Eisenhydroxamatbereich auftreten, der aber nicht unbedingt an exponierter Stelle des Moleküls liegen muß. Die Rezeptoren sollten eine spezifische Erkennungsstelle für ihren jeweiligen Chelator besitzen, der auf die chemische Raumstruktur des jeweiligen Moleküls abgestimmt ist. Möglicherweise wird das adsorbierte Molekül beim Weiterreichen an die folgenden Funktionen in einer Form präsentiert, die den Eisenhydroxamatteil stärker betont, so daß den Proteinen der Cytoplasmamembran die jeweils ähnlichen Strukturen der verschiedenen Eisenchelatkomplexe angeboten werden. Der Rezeptor hätte hier einmal die Aufgabe, das Eisenhydroxamatmolekül zu erkennen, zum anderen eine bestimmte räumliche Ausrichtung oder gar konformationelle Verschiebung des Molekülgerüstet vorzunehmen.
Dem Preis der höheren Spezifität der Eisenhydroxamatrezeptorproteine in der äußeren Membran durch größeren Einsatz an Material und Energie steht als Gewinn eine gesteigerte Affinität jedes Rezeptors zu seinem Substrat gegenüber. Die $K_M$-Werte dürften für die jeweiligen Substrat-Rezeptorpaare

niedriger liegen als für den gedachten Fall, daß nur ein Rezeptorprotein für die Adsorption strukturell unterschiedlicher Moleküle verwendet wird. Möglicherweise verschafft der Einsatz spezifischer Rezeptorproteine bei der Eisenanreicherung in unterschiedlichen Biotopen langfristig einen Wachstumsvorteil für E.coli Stämme, die eine effektivere Eisenanreicherung durchführen können.

## 4.2. Ferrichrommodifizierung

Ferrichrom wird bei der Eisenaufnahme modifiziert. Im Medium sind äquimolare Mengen modifizierten Ferrichroms nachzuweisen. Die Ferrichrommodifizierung wird vermutlich an der Membran durchgeführt. Nach Inkubation mit einer Cytoplasmafraktion kann kein modifiziertes Ferrichrom nachgewiesen werden. In welchem Membranteil die Aktivität lokalisiert ist, konnte bis jetzt nicht geklärt werden, da getrennte Membranfraktionen dieselbe Aktivität zeigen. Vermutlich löst sich die Aktivität von ihrem Wirkort und verteilt sich gleichmäßig über alle Membranbereiche (101). Da die Modifizierungsaktivität energiereiche Cofaktoren benötigt, kommt als Wirkort eher die Cytoplasmamembran in Frage.

Die Ferrichrommodifizierung scheint eine für Ferrichrom spezifische Reaktion zu sein, da für das Hydroxamatmolekül Aerobactin keine Modifizierung nachgewiesen werden konnte.

Die Modifizierung ist mit Acetyl-P stimulierbar. Beseitigt man Acetyl-P mit alkalischer Phosphatase aus dem Reaktionsansatz, kann kein modifiziertes Ferrichrom mehr nachgewiesen werden. Man muß Acetyl-P neben NADH als weiteres Cosubstrat ansehen. Das Substrat für die modifizierende Aktivität dürfte Desferri-Ferrichrom sein. Ferrichrom wird ohne NADH nicht modifiziert, wohingegen Desferri-Ferrichrom umgesetzt wird. Der modifizierende Faktor kann keinem Gen zugeordnet

werden, das an der Eisenaufnahme über Ferrichrom beteiligt ist. Mutanten in den fhu Genen, tonB oder exbB modifizierten Ferrichrom wie der Kontrollstamm AB2847.
Zur gründlichen Charaterisierung der Modifizierungsaktivität würden Mutanten benötigt, die diese Funktion verloren haben. Nach MNNG-Mutagenese konnten Stämme isoliert werden, die keine Ferrichrommodifizierung mehr ausführten. Die Stämme erwiesen sich als sehr instabil, ihre Überlebensfähigkeit war stark beeinträchtigt. Ein direkter Zusammenhang zwischen Eisenaufnahme über Ferrichrom und Modifizierung konnte nicht aufgezeigt werden, da die Rezeptoreigenschaften der äußeren Membran dieser Zellen so stark verändert waren, daß deshalb kein Eisentransport über Ferrichrom mehr stattfinden konnte. Nach Tn10 Mutagenese konnten im gewählten Selektionssystem keine Mutanten gefunden werden. Diese Ergebnisse lassen den Verdacht aufkommen, daß durch die Mutagenese ein Genelement getroffen wurde, das sich bei Fehlen letal auf die Zellen auswirkt. Da die MNNG-Mutagenese Punktmutation setzt, könnten durchaus noch teilweise funktionierende Einheiten des Enzyms für ein eingeschränktes Überleben hergestellt werden. Die Tn10 Mutagenese führt zum Totalausfall des betroffenen Genbereichs.
Die Modifizierungsfunktion selbst muß dabei kein überlebenswichtiges Element für die Zellen ausmachen. Die Selektion wurde aufgrund der Arbeitshypothese aufgebaut, daß die Modifizierung hauptsächlich für die Beseitigung des Desferri-Liganden verantwortlich ist. Diese Hypothese muß nicht den tatsächlichen Vorgängen in den Zellen entsprechen. Eine Aussage darüber könnte man erst dann machen, wenn man Mutanten in den Händen hätte.
Die Selektion könnte auch neben dem gewünschten Effekt unerwünschte Wirkungen entfalten, wenn von dem verwendeten Selektionssystem noch andere physiologische Vorgänge betroffen würden.

Die Modifizierung der Maltose durch Stämme, die den Zucker nicht mehr verwenden können, zeigt Ähnlichkeiten mit der Ferrichrommodifizierung (9). Wie bei Ferrichrom besteht die che-

mische Veränderung in der kovalenten Kopplung einer Acetyl-Gruppe. Die Funktion für die Maltosemodifizierung kann in keinen Zusammenhang mit Genen gebracht werden, die Aufnahme oder Verwertung der Maltose in den Zellen betreffen. Im Falle des Ferrichroms gelingt es gleichfalls nicht, die Ferrichrommodifizierung einem der bekannten Genorte für die Ferrichromaufnahme zuzuordnen. Im Unterschied zur Ferrichrommodifizierung gibt es bei der Maltosemodifizierung keinen quantitativen Zusammenhang zwischen Maltoseaufnahme und Modifizierung. Das Ausmaß der Reaktion bleibt unter dem der Ferrichrommodifizierung. Modifizierte Maltose kann im Gegensatz zu modifiziertem Ferrichrom nicht mehr in die Zellen aufgenommen werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen Maltosemodifizierung und Ferrichrommodifizierung konnte bisher nicht hergestellt werden.

Welchen Zweck könnte die Ferrichrommodifizierung im Zellgeschehen von E.coli erfüllen?

a) Da Desferri-Ferrichrom ein starker Eisenkomplexbildner ist, könnte er innerhalb der Zelle in Wechselwirkung mit dem Eisenstoffwechsel treten. Um dies zu verhindern, könnte die Zelle durch Modifizierung die Eisenaffinität des Desferri-Liganden herabsetzen und ihn gleichzeitig in einer Art Entgiftungsreaktion aus der Zelle ausschleusen.

b) Die Modifizierungsreaktion könnte mit NADH als Cofaktor der wirksame Mechanismus sein, um Eisen aus Ferrichrom freizusetzen.

c) Durch die Modifizierung könnte E.coli die wirksame Eisenchelatorkonzentration von Konkurrenzorganismen herabsetzen und sich dadurch Wachstumsvorteile verschaffen.

## 4.3. Aerobactinmodifizierung

Die Eisenaufnahme aus Ferri-Aerobactin erfolgt ohne Modifizierung des Aerobactinmoleküls. Mit Zellmaterial inkubiertes radioaktiv markiertes Aerobactin zeigte in drei verschiedenen DC-Systemen keine zusätzlichen Komponenten, die man als modifiziertes Aerobactin oder auch als Abbauprodukt von Aerobactin hätte ansehen können. Transportversuche und Wachstumsversuche auf Eisenmangelplatten lassen eher den Schluß zu, daß Aerobactin wiederholt Eisen komplexieren und in die Zellen transportieren kann. Die Eisenaufnahme über Ferri-Aerobactin und Ferrichrom unterscheidet sich offensichtlich an diesem Punkt, da Ferrichrom nach der Eisenaufnahme in chemisch veränderter Form im Medium auftritt und nur einmal pro Eisenäquivalent zum Eisentransport verwendet werden kann. Die Modifizierung des eisenfreien Chelators tritt spezifisch bei Ferrichrom auf. Die Zelle verfügt für Aerobactin über einen Ausscheidungsmechanismus, der die Affinität des Chelators nicht verändert. Das Aerobactinmolekül kann nach Freisetzung des Eisens diesen Weg immer wieder passieren. Die Wiederverwendungsmöglichkeit des Aerobactinmoleküls spielt möglicherweise bei der Eisenversorgung pathogener E.coli Stämme eine wichtige Rolle. Die Geschwindigkeit des Eisentransports mit Ferri-Aerobactin ist verglichen mit Ferrichrom und Enterochelin deutlich verringert. Die Wiederverwendungsmöglichkeit des Aerobactinmoleküls könnte in bestimmten Biotopen, z.B. Körperflüssigkeiten, die Verbreitung des Aerobactineisentransports begünstigen, da die Zelle so ökonomischer ihre Energievorräte einteilen kann. Der Nachteil der geringen Eisenaufnahmerate pro Zeiteinheit über Aerobactin fällt vermutlich in solchen Umgebungen nicht sehr ins Gewicht, da die Generationszeit durch andere Faktoren begrenzt wird, so daß sich ein balancierter Zustand zwischen Eisenbedarf und Nachschub ausbilden könnte. Denkbar wäre auch, daß im Körper der Eisentransport über Enterochelin schlechter funktioniert als über Aerobactin, wenn gegen Enterochelin effektive Abwehrmechanismen, z.B. Antikörper, eingesetzt werden können (82, 83).

Das Aerobactinmolekül wird vermutlich nicht in E.coli angereichert.

Mit Bacillus megaterium konnte man zeigen, daß dieser radioaktiv markiertes Schizokinen bis zu einer bestimmten Menge in die Zelle aufnimmt, von wo es anschließend wieder freigesetzt werden kann. Man fand bei diesen Bakterien keinen Hinweis auf Abbau oder chemische Veränderungen dieses Chelators (1). Aus Neisseria meningitidis und Neisseria gonorrhöae kann eine geringe Menge eines Di-Hydroxamatmoleküls (Gonobactin bzw. Meningobactin) freigesetzt werden (124).

Aufnahmeversuche mit radioaktiv markiertem Aerobactin durch einen ColV-Plasmid-haltigen E.coli Stamm zeigten keine Anreicherung des Chelators im Zellinnern. Möglicherweise unterscheidet die Zelle aber Aerobactin, das von außen kommt, von Molekülen, die selbst produziert werden, über verschiedene Wege im Stoffwechsel. Denkbar wäre, daß die Konzentration im Zellinnern eine bestimmte Menge überschreiten muß, bevor es ausgeschieden wird.

## 4.4. Eisenreduktion

Eisen(III) aus Ferrichrom und Aerobactin wird reduziert, wenn eine ausreichende Menge NADH im Ansatz vorliegt. Das Ausmaß der Eisenfreisetzung wird durch Gesamtmembranen nicht stimuliert. Das Redoxpotential von NADH reicht aus, um das Ferrichromeisen zu reduzieren. Für die fehlende Membrankatalyse sind verschiedene Erklärungen vorstellbar. Ein reduzierendes Enzym könnte im Verlauf der Aufarbeitung verloren gehen. Denkbar wäre aber auch, daß ein reduzierendes Enzym für Eisen aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin nicht in der Membran, sondern im Cytoplasma lokalisiert ist. Dies steht aber in gewissem Gegensatz zu Ergebnissen mit polymergebundenem Ferricrocin, nach denen eine Eisenaufnahme aus einem gekoppelten Chelator möglich ist, der nicht in die Zelle eindringen kann (29). Man findet in einem S-100 Überstand nach Ul-

trazentrifugation und chromatographischer Anreicherung eine deutliche Stimulierung der Eisenfreisetzung aus Ferrichrom und Ferri-Aerobactin (102). Nach der Eisenreduktion aus Ferrichrom im Cytoplasma könnte ein membrangebundener Faktor den Liganden chemisch modifizieren und dabei ins Medium abgeben. Im in vitro Ansatz zur Ferrichrommodifizierung erfolgt die Eisenfreisetzung wahrscheinlich nicht durch eine Reduktase, sondern durch das Redoxpotential von NADH. Die enzymatische Reduktion des Eisens aus Ferrichrom und die Modifizierung sind keine eng gekoppelten Reaktionen.

In früheren Untersuchungen konnte eine Reihe von Reduktaseaktivitäten in Cytoplasma und Membran nachgewiesen werden. Die Eisenfreisetzung aus Enterochelin erfolgt im Cytoplasma. Es gibt Hinweise, daß die für eine Esterase gehaltene Aktivität als Reduktase für Enterochelineisen funktioniert. Bei E.coli wurde für $Fe^{3+}$ eine Reduktaseaktivität in der Membran nachgewiesen werden, die NADH oder Succinat als Cosubstrate verwendet (32). Membrangebundene Reduktaseaktivität für $Fe^{3+}$ mit NADH oder Succinat als Cosubstrat fand man auch bei Spirillum itersonii, Pseudomonas denitrificans, Rhodopseudomonas spheroides, Rhodopseudomonas capsulata und Paracoccus denitrificans (32).
Einige Organismen wurden beschrieben, deren reduzierende Aktivität für Eisen im Cytoplasma lokalisiert wird. Mycobacterium smegmatis setzt Eisen aus Ferri-Mycobactin mit einer Reduktase frei, die NADH oder NADPH als Cosubstrate verwendet. Dieses Enzym kann nur im Cytoplasma nachgewiesen werden (25).
Bacillus megaterium besitzt eine NADPH-abhängige Reduktase im Cytoplasma für Ferri-Schizokinen und Ferrioxamin B (2).
Bei Pseudomonas aeruginosa findet man zwei Reduktaseaktivitäten, die beide NADH-abhängig sind. Eine Reduktase setzt Eisen aus Ferricitrat, die andere aus Ferri-Pyochelin frei. Beide Aktivitäten können in der löslichen Zellfraktion gefunden werden. Die Pyochelinreduktase tritt gleichzeitig im Periplasma auf, wobei noch ungeklärt ist, wie die Wechsel-

wirkung mit NADH vor sich geht (31).

## 4.5. Eisentransport über Hydroxamate

Im folgenden wird ein zusammengefaßtes Bild des Hydroxamattransportes bei E.coli skizziert. Jeder Hydroxamatchelator (Ferrichrom, Aerobactin, Coprogen) besitzt einen eigenen, für ihn spezifischen Rezeptor, in der äußeren Membran. Dieser erkennt die jeweiligen Ferrihydroxamate vermutlich an ihrer Konfiguration oder spezifischen chemischen Gruppen. Der Hydroxamatchelator wird vom Rezeptor möglicherweise in räumlich ausgerichteter Art an Funktionen der Cytoplasmamembran weitergereicht, wobei der Ferri-Hydroxamatteil der jeweiligen Moleküle stärker exponiert wird. Für die verschiedenen Chelatoren werden dieselben Funktionen der Cytoplasmamembran verwendet.
Das Produkt des Gens tonB vermittelt möglicherweise Energie von der Cytoplasmamembran zur äußeren Membran. Die Funktion von exbB muß noch aufgeklärt werden. Die Gene fhuB, C, D vermitteln Vorgänge in der Cytoplasmamembran. Ihre Produkte bewirken als Resultat den Durchtritt von Eisen durch die Cytoplasmamembran. Wo die Eisenfreisetzung aus den Hydroxamaten stattfindet, bleibt noch offen. Sie erfolgt möglicherweise im Cytoplasma durch spezifische Reduktasen und entsprechenden Cosubstraten (NADH, NADPH). Nach der Eisenfreisetzung fließen die $Fe^{2+}$-Ionen in den Stoffwechsel ein, die Hydroxamate werden in differenzierter Weise weiterbehandelt. Desferri-Ferrichrom wird in chemisch modifizierter Form ausgeschieden. Aerobactin wird unverändert ins Medium abgegeben. Das Antibiotikum Albomycin mit demselben Aufnahmeweg wie Ferrichrom wird nach Eisenfreisetzung durch Peptidase N in zwei Hälften gespalten (17). Den Hydroxamatteil findet man im Medium (3). Ob er modifiziert vorliegt, ist nicht bekannt.
Coprogen muß in seinem Eisentransportverhalten noch detaillierter erforscht werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Entfernen von Acetyl-P mit alkalischer Phosphatase aus Inkubationsansätzen zur Ferrichrommodifizierung konnte dieses Molekül als Cosubstrat der Modifizierung identifiziert werden. Die Modifizierung erfolgt mit Desferri-Ferrichrom nach Eisenfreisetzung. Die Enzyme NADH-Dehydrogenase und NADH-Oxidase konnten nicht mit der Eisenfreisetzung aus Ferrichrom in Zusammenhang gebracht werden. Es wurde keine membrankatalysierte Eisenreduktion aus Ferrichrom und Aerobactin gefunden. Das Redoxpotential von NADH reicht aus, das Eisen der Hydroxamate zu reduzieren.
Die Ferrichrommodifizierung konnte mit keinem Gen für die Eisenaufnahme über Ferrichrom und Aerobactin identifiziert werden. Mutanten in der Ferrichrommodifizierung gaben keinen Hinweis auf die funktionelle Rolle der Modifizierung im Zellgeschehen.
Aerobactin wird beim Eisentransport nicht modifiziert. Es kann mehrfach zum Eisentransport verwendet werden; fhuA ist nicht an der Eisenaufnahme über Aerobactin beteiligt. Es wurden Mutanten isoliert, die Aerobactin nicht mehr synthetisieren, aber $Fe^{3+}$ über Aerobactin noch transportieren können.

## 6. LITERATUR


1. Arceneaux, J.E.L., Davis, W.B., Downer, D.N., Haydon, A.H., Byers, B.R. (1973) J. Bacteriol. 115, 919-927

2. Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R. (1980) J. Bacteriol. 141, 715-721

3. Benz, G., Schröder, T., Kurz, J., Wünsche, C., Karl, W., Steffens, G., Pfitzner, J., Schmidt, D. (1982) Angew. Chem. Suppl., 1322-1335

4. Benz, R., Janko, K., Boos, W., Läuger, P. (1978) Biochim. Biophys. Acta 511, 305-319

5. Benz, R., Janko, K., Läuger, P. (1979) Biochim. Biophys. Acta 511, 238-247

6. Bindereif, A., Neilands, J.B. (1983) J. Bacteriol. 153, 1111-1113

7. Bindereif, A., Braun, V., Hantke, K. (1982) J. Bacteriol. 150, 1472-1475

8. Binns, M.M., Davies, D.L., Hardy, K.G. (1979) Nature 279, 778-781

9. Boss, W., Ferenci, T., Shumann, H.A. (1981) J. Bacteriol. 146, 725-732

10. Boyd, A., Holland, I.B. (1979) Cell 18, 287-296

11. Braun, V. (1978) Structure-function relationships of the gramnegative bacterial cell envelope, in: Relations between Structure and Function in the Prokaryotic Cell (R.Y. Stanier, H.J. Rogers, and B.J. Ward, eds.), Cambridge University Press

12. Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11, 225-228

13. Braun, V., Burkhardt, R. (1982) J. Bacteriol. 152, 223-231

14. Braun, V., Burkhardt, R., Schneider, R., Zimmermann, L. (1982) J. Bacteriol. 152, 553-559

15. Braun, V., Frenz, S., Hantke, K., Schaller, K. (1980) J. Bacteriol 142, 162-168

16. Braun, V., Gross, R., Köster, W., Zimmermann, L. (1983) J. Bacteriol.

17. Braun, V., Günthner, K., Hantke, K., Zimmermann, L. (1983) J. Bacteriol.

18. Braun, V., Hancock, R.E.W., Hantke, K., Hartmann, A. (1976) J. Supramol Struct. 5, 37-58

19. Braun, V., Hantke, K. (1977) Bacterial receptors for phages and colicins as constituents of specific transport systems, in: Microbial Interactions (Receptors and Recognition, Series B), Volume 3 (J.L. Reissig, ed.), Chapman and Hall, London, pp. 101-130

20. Braun, V., Hantke, K. (1981) Bacterial cell surface receptors, in: Organization of Prokaryotic Cell Membranes, Volume II (B.K. Ghosh, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 1-74

21. Braun, V., Hantke, K. (1982) Receptor-dependent transport systems in Escherichia coli for iron complexes and vitamin B12, in: Membranes and Transport, Volume 2 (A.N. Martonosi, ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 107-113

22. Braun, V. (1983) in: The Enzymes of Biological Membranes (A.N. Martonosi, ed.), Plenum Press, New York

23. Braun, V., Krieger-Brauer, H.J. (1977) Biochim. Biophys. Acta 469, 89-98

24. Braun, V., Schaller, K., Wolff, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 328, 87-97

25. Brown, K.A., Ratledge, C. (1975) FEBS Lett. 53, 262-266

26. Bryce, G.F., Brot, N. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 399-406

27. Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4530-4533

28. Clancy, J., Savage, D.C. (1981) J. Infect. Immun. 32, 343-352

29. Coulton, J.W., Braun, V. (1979) J. Gen. Microbiol. 110, 211-220

30. Coulton, J.W., Naegeli, H.-U., Braun, V. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 39-47

31. Cox, C.D. (1980) J. Bacteriol. 141, 199-204

32. Dailey, H.A., Lascelles, J. (1977) J. Bacteriol. 129, 815-820

33. DiRienzo, J.M., Nakamura, K., Jinouye, M. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47, 481-532

34. Emery, T. (1971) Biochem. 10, 1483-1488

35. Fecker, L., Braun, V. (1983) J. Bacteriol

36. Eberspächer, B., Braun, V. (1980) FEMS Microbiol. Lett. 7, 61-64

37. Ferenci, T. (1980) Eur. J. Biochem. 108, 631-636

38. Ferenci, T., Boos, W. (1980) J. Supramolec. Struct. 13, 101-116

39. Ferenci, T., Schwentorat, M., Ullrich, S., Vilmart, J. (1980) J. Bacteriol. 142, 521-526

40. Frost, G.E., Rosenberg, H. (1973) Biochim. Biophys. Acta 330, 90-101

41. Frost, G.E., Rosenberg, H. (1975) J. Bacteriol. 124, 704-712

42. Gibson, F., Magrath, D.J. (1969) Biochim Biophys. Acta 192, 175-184

43. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 454, 285-287

44. Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 525, 209-218

45. Greval, K.K., Warner, P.J., Williams, P.H. (1982) FEBS Lett. 140, 27-30

46. Hall, B. (1982) J. Bacteriol. 151, 269-273

47. Hamed, M.Y., Hider, R.C., Silver, J. (1982) Inorg. Chimica Acta 66, 13-18

48. Hancock, R.E.W., Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 125, 409-415

49. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1976) J. Bacteriol. 127, 1370-1375

50. Hancock, R.E.W., Hantke, K., Braun, V. (1977) Arch. Microbiol. 114, 231-239

51. Hantke, K. (1981) Molec. gen. Genet. 182, 288-292

52. Hantke, K. (1982) FEMS Microbiol. Lett. 15, 83-86

53. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 59, 277-281

54. Hantke, K., Braun, V. (1975) FEBS Lett. 49, 301-305

55. Hantke, K., Braun, V. (1978) J. Bacteriol 135, 190-197

56. Hantke, K., Zimmermann, L. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 31-35

57. Hantke, K. (1983) Mol. Gen. Genet.

58. Harris, W.R., Carrano, C.J., Raymond, K.N. (1979) J. Amer. Chem. Soc 101, 2722-2727

59. Harris, W.R., Carrano, C.J., Cooper, S.R., Sofen, S.R., Avdeef, A.E., McArdle, J.V., Raymond, K.N. (1979) J. Amer. Chem. Soc. 101, 6097-6104

60. Hartmann, A., Braun, V. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 517-524

61. Hartmann, A., Braun, V. (1980) J. Bacteriol. 143, 246-255

62. Hartmann, A., Braun, V. (1981) Arch. Microbiol. 130, 353-356

63. Heidinger, S., Braun, V., Pecoraro, V.L., Raymond, K.N. (1983) J. Bacteriol.

64. Hider, R.C., Silver, J., Neilands, J.B., Morrison, I.E.G., Rees, L.V.E. (1979) FEBS Lett. 102, 325-328

65. Hollifield, W.C., Neilands, J.B. (1978) Biochemistry 17, 1922-1928

66. Hussein, S., Hantke, K., Braun, V. (1981) Eur. J. Biochem. 117, 431-437

67. Ichihara, S., Mizushima, S. (1978) J. Biochem. 83, 137-140

68. Kadner, R.J., Heller, K., Coulton, J.W., Braun, V. (1980) J. Bacteriol. 143, 256-264

69. Klebba, P.E., McIntosh, M.A., Neilands, J.B. (1982) J. Bacteriol. 149, 880-888

70. Kleckner, N., Chan, R., Tye, B.K., Botstein, D. (1975) J. Mol. Biol. 97, 761-775

71. Krone, W.J.A., Oudega, B., Stegehuis, F., de Graaf, F. (1983) J. Bacteriol. 153, 716-721

72. Laemli, U.K. (1970), Nature 222, 680-685

73. Laird, A.J., Young, I.G. (1980) Gene 11, 359-366

74. Laird, A.J., Ribbons, D.W., Woodrow, G.C., Young, I.G. (1980) Gene 11, 347-357

75. Langmann, L., Young, I.G., Frost, G.E., Rosenberg, H., Gibson, F. (1972) J. Bacteriol. 112, 1142-1149

76. Leong, J., Neilands, J.C. (1976) J. Bacteriol. 126, 823-830

77. Lodge, J.S., Gaines, C.G., Arceneaux, J.E.L., Byers, B.R. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 1291-1295

78. Luckey, M., Wayne, R., Neilands, J.B. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 687-693

79. Lugtenberg, B., Neijers, J., Peters, R., van der Hoek, P., van Alphen, L. (1975) FEBS Lett. 58, 254-258

80. McIntosh, M.A., Chenault, S.S., Earhart, C.F. (1979) J. Bacteriol. 137, 653-657

81. Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, N.Y.

82. Moore, D.G., Earhart, C.F. (1981) Enfect. Immun. 31, 631-635

83. Moore, D.G., Yancay, J., Lankford, C.E., Earhart, C.F. (1980) Infect. Immun. 27, 418-423

84. Murray, G.J., Clark, G.E.D., Parniak, M.A., Viswanatha, T. (1977) Can. J. Biochem. 55, 625-629

85. Neilands, J.B. (1974) in: Microbial Iron Metabolism (Neilands, J.B., ed.) Academic Press, New York and London

86. Neilands, J.B. (1981) Ann. Rev. Biochemistry 50, 751-731

87. Neilands, J.B. (1982) Ann. Rev. Microbiol. 36, 285-309

88. Negrin, R.S., Neilands, J.B. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2339-2342

89. Parniak, M.A., Jackson, G.E.D., Murray, G.J., Viswanatha, T. (1979) Biochim. Biophys. Acta 569, 99-108

90. Payne, S.M. (1980) J. Bacteriol. 143, 1420-1424

91. Perry, R.D., San Clemente, C.L. (1979) J. Bacteriol. 140, 1129-1132

92. Pittard, J., Wallace, B.J. (1966) J. Bacteriol. 91, 1494-1508

93. Plastow, G.S., Holland, J.B. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1007-1014

94. Plastow, G.S., Pratt, J.M. (1981) FEBS Microbiol. Lett. 131, 262-264

95. Postle, K., Reznikoff, W. (1979) J. Mol. Biol. 131, 619-636

96. Pugsley, A.P., Reeves, P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 903-911

97. Raymond, K.N., Carrano, C.J. (1979) Accounts. chem. Res. 12, 183-190

98. Reynolds, P.R., Mottur, G.P., Bradbeer, C. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4313-4319

99. Rosenberg, H., Young, I.G. (1974) Iron transport in the enteric bacteris, in: Microbial Iron Metabolism (J.B. Neilands et al., eds.), Academic Press, New York, London, pp. 67-82

100. Schneider, R., Hartmann, A., Braun, V. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 11. 115-119

101. Schneider, R. (1980) Diplomarbeit, Universität Tübingen

102. Strehlow, B. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

103. Stuart, S.J., Greenwood, K.T., Luke, R.K.J. (1980) J. Bacteriol. 143, 35-40

104. Spiro, T.G., Saltmann, P. (1969) Struct. Bonding 6, 116-156

105. Udenfried, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W., Weigele, M. (1972) Science 178, 871-872

106. van der Helm, D., Baker, J.R., Eng-Wilmot, D.L., Hossain, M.B., Loghry, R.A. (1980) J. Amer. Chem. Soc. 104, 4224-4231

107. van Tiel-Menkveld, G.J., Oudega, B., Kempers, O., de Graaf, F.K. (1981) FEMS Microbiol. Lett. 12, 373-380

108. van Tiel-Menkveld, G.J., Mentjox-Vervuurt, J.M., Oudega, B., de Graaf, F.K. (1982) J. Bacteriol. 150, 490-497

109. Venuti, M.C., Rastetter, W.H., Neilands, J.B. (1979) J. Med. Chem. 22, 123-124

110. Wagegg, W., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 145, 156-163

111. Wang, C.C., Newton, A. (1971) J. biol. Chem. 246, 2147-2151

112. Warner, P.J., Williams, P.H., Bindereif, A., Neilands, J.B. (1981) Infect. Immun. 33, 540-545

113. Weaver, C.H., Konisky, J. (1980) J. Bacteriol. 143, 1513-1518

114. Weinberg, E.D. (1978) Microbiol. Rev. 42, 45-66

115. Williams, P. (1979) Infect. Immun. 26, 925-932

116. Williams, P.H., George, H.K. (1979) in: Plasmids of medical, environmental and commercial importance (K.N. Timmis and A. Pühler, eds.) Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdamm, pp. 161-172

117. Williams, P., Warner, P.J. (1980) Infect. Immun. 29, 411-416

118. Woodrow, C.W. Young, I.G., Gibson, F. (1979) Biochem. Biophys. Acta 582, 145-153

119. Woodrow, G.C., Langman, L., Young, I.G., Gibson, F. (1978) J. Bacteriol. 133, 1524-1526

120. Wookey, P. (1982) FEBS Microbiol. Lett. 139, 145-154

121. Wookey, P., Hussein, S., Braun, V. (1981) J. Bacteriol. 146, 1158-1161

122. Wookey, P., Rosenberg, H. (1978) J. Bacteriol. 133, 661-666

123. Worsham P.L., Konisky, J. (1981) J. Bacteriol. 145, 647-650

124. Yancey, R.J., Finkelstein, R.A. (1981) Infect. Immun. 32, 600-608

125. Zähner, H., Keller-Schierlein, W., Hütter, R., Hess-Leisinger, K., Deér, A. (1963) Arch. Microbiol. 45, 119-135

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 11.2.1953 | geboren in Bad Mergentheim |
| 1960-1964 | Grundschule in Eybach |
| 1964-1966 | Realschule in Geislingen/Steige |
| 1966-1973 | Humanistisches Gymnasium Riedlingen |
| 7.6.1973 | Abitur |
| 1973-1974 | Wehrdienst |
| ab SS 1975 | Biologiestudium an der Universität Tübingen |
| 25.4.1977 | Diplomvorprüfung in Biologie |
| 18.6.1980 | Diplomhauptprüfung in Biologie<br>Hauptfach Mikrobiologie<br>anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. V. Braun |

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, W. Bessler, V. Braun, D. Bunke, H. Frank,
J. Guglielmi, K.-P. Hadeler, A. Hager, V. Hemleben,
K. Hantke, G. Jung, W. Löffler, D. Mecke, H. Meier,
H. Metzner, G.F. Meyer, W. Nakel, F. Oberwinkler,
K. Pelling, W. Rähle, A. Rieker, E. Sander, B. Schwemmle,
H. Seiler, W. Seyffert, D. Sperlich, H. Stegmann,
J. Strähle, H. Straub, G. Weitzel, P. Wenk, K. Wöhrmann,
H. Wolf, H. Zähner.